

Mikołaj Matłoka

## **Nowy inhibitor fosfodiesterazy 10A jako potencjalny lek w terapii schizofrenii**

Praca doktorska  
wykonana w Dziale Badań Przedklinicznych  
Celon Pharma S.A.  
oraz  
w Pracowni Neurobiologii  
Instytutu Biologii Doświadczalnej  
im. M. Nenckiego PAN

**PROMOTOR:**  
**Prof. dr hab. Leszek Kaczmarek**

**PROMOTOR POMOCNICZY:**  
**Dr Jerzy Pieczykołan**

Warszawa, 2022

*Niniejsza praca została wykonana ze wsparciem finansowym udzielonym przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (STRATEGMED2/268248/9/NCBiR/2015, akronim: NoteSzHD)*

*Chciałbym podziękować wszystkim, dzięki którym ta praca powstała, a w szczególności:*

*Profesorowi Leszkowi Kaczmarkowi – za możliwość wykonania pracy doktorskiej pod swoją opieką, wsparcie merytoryczne, udzielane wskazówki oraz niestrudzoną motywację do ukończenia rzeczy ważnych i ważniejszych.*

*Doktorowi Jerzemu Pieczykolanowi – za wsparcie udzielone w trakcie powstawania pracy i motywację do jej ukończenia.*

*Doktorowi Maciejowi Wieczorkowi – za możliwość wykonania pracy doktorskiej w firmie Celon Pharma S.A.*

*Doktorowi Łukaszowi Bojarskiemu – dzięki któremu ten doktorat w ogóle się rozpoczął.*

*Piotrowi Pankiewiczowi i Sylwii Janowskiej – trzonowi Grupy Neuro, za nieocenione wsparcie w przeprowadzeniu eksperymentów i za wspólny rozwój projektu.*

*Rafałowi Moszczyńskiemu-Pętkowskiemu, Aleksandrze Stańczak, Katarzynie Bazydło-Guzendzie, Michałowi Górcie i Katarzynie Kalicie-Bykowskiej - za liczne dyskusje i wsparcie naukowe.*

*Markowi Popielarskiemu, Johannesowi Schmidt – za dyskusje nie tylko naukowe.*

*Rodzicom – za to, że miałem możliwość podążać za marzeniami.*

*Magdzie – za to, że starszy brat musiał dogonić młodszą siostrę.*

*Mojej Żonie – za wsparcie, cierpliwość i zrozumienie. Bez Ciebie nie udałoby się.*

*Mariannie – za nieocenioną ilość uśmiechów nawet przy największych przeszkodach.*

Chciałbym również podziękować za pomoc w przeprowadzaniu eksperymentów:

- *Dr. Filipowi Stefaniakowi, Dział Chemii Medycznej, Celon Pharma S.A., za przeprowadzenie analizy Pareto.*
- *Dr Bożenie Winnik, Selvita S.A., za wykonanie doświadczenia stabilności metabolicznej.*
- *Joannie Hucz-Kalitowskiej, Zespół ds. Badań in vivo, Celon Pharma S.A. za pomoc w organizacji doświadczeń in vivo i przygotowanie roztworów formulacyjnych.*
- *Ewie Sacharzewskiej, Małgorzacie Mackiewicz, Dianie Sawickiej i Agnieszce Popielskiej, Centrum Medycyny Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, za wykonanie podań i pobranie tkanek do przesiewowego badania farmakokinetycznego.*
- *Pawłowi Olszewskiemu i Tycjanowi Kolanko, Blirt S.A., za wykonanie pomiaru stężenia związków w osoczu i w mózgu w farmakokinetycznym badaniu przesiewowym u szczurów.*
- *Prof. Piotrowi Popikowi oraz dr. Tomaszowi Kosowi, Zakład Badań Nowych Leków, Instytut Farmakologii im. J. Maja PAN za wykonanie doświadczenia behawioralnego hiperlokomocji indukowanej.*
- *Grażynie Peszyńskiej-Sularz, Beacie Muszyńskiej-Furas, Monice Dmochowskiej i Agnieszce Jakubiak, Trójmiejska Akademicka Zwierzętarńia Doświadczalna Centrum Badawczo-Uługowego Gdańskiego Uniwersytety Medycznego, za wykonanie podań i pobranie tkanek do charakterystyki farmakokinetycznej.*
- *Dr Monice Janickiej i dr. Krzysztofowi Abramskiemu, Laboratorium Bioanaliz, Celon Pharma S.A., za wykonanie pomiaru stężenia związków w osoczu i w mózgu.*
- *Prof. Pawłowi Griebowi, dr. Maciejowi Świątkiewiczowi i Marlenie Wełniak-Kamińskiej, Zakład Farmakologii Doświadczalnej, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN, za wykonanie podań, uśmiercenia i izolowania tkanek u szczurów.*

## SPIIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW.....	9
1 WSTĘP .....	12
1.1 Schizofrenia .....	12
1.2 Hipoteza dopaminowa i glutaminianowa jako podłoże molekularne schizofrenii.....	13
1.3 Prążkowie .....	15
1.3.1 Budowa prążkowie .....	15
1.3.2 Średnie neurony kolczaste.....	17
1.3.3 Kaskada sygnałowa zależna od dopaminy i cyklicznych nukleotydów.....	19
1.4 Fosfodiesteraza 10A .....	22
1.4.1 Rodzina fosfodiesteraz .....	22
1.4.2 Struktura, ekspresja i rola PDE10A w przekaźnictwie sygnałów w prążkowie.....	22
1.4.3 PDE10A jako cel interwencji farmakologicznej .....	24
1.4.4 Wpływ inhibitorów PDE10A na przekaźnictwo sygnałowe .....	26
1.4.5 Efekty behawioralne zahamowania aktywności PDE10A.....	28
1.4.6 Badania kliniczne inhibitorów PDE10A.....	29
1.5 Proces rozwoju leku drobnocząsteczkowego.....	30
2 CELE PRACY .....	33
3 MATERIAŁY I METODY .....	34
3.1 Biblioteka związków drobnocząsteczkowych.....	35
3.2 Rozpuszczalność .....	36
3.3 Test enzymatyczny inhibicji fosfodiesteraz .....	37
3.3.1 Fosfodiesterazy .....	37
3.3.2 Procedura przeprowadzenia testu .....	37
3.4 Analiza Pareto.....	38
3.5 Test stabilności metabolicznej I fazy .....	38
3.6 Przesiewowe badanie farmakokinetyczne i farmakodynamiczne .....	40
3.6.1 Przebieg podania związków i izolowania tkanek.....	40
3.6.2 Pomiar stężeń związków w badaniu przesiewowym.....	40
3.6.3 Analiza fosforylacji GluR1 metodą Western blot .....	41
3.7 Rozszerzone badania farmakokinetyczne .....	44
3.7.1 Model zwierzęcy, podanie CPL500036 i pobranie materiału do analiz.....	44
3.7.2 Pomiar stężeń związków.....	45
3.7.3 Analiza parametrów farmakokinetycznych .....	46
3.8 Badanie farmakodynamiczne .....	47
3.8.1 Model zwierzęcy, podanie związków i pobranie materiału do analiz.....	47
3.8.2 Stężenie cyklicznych nukleotydów .....	48
3.8.3 Badanie ekspresji genów .....	48
3.9 Analiza statystyczna .....	51
4 WYNIKI .....	52

4.1	Badania przesiewowe w poszukiwaniu drobnocząsteczkowego związku wiodącego hamującego aktywność PDE10A .....	52
4.1.1	Badanie rozpuszczalności .....	52
4.1.2	Badanie inhibicji PDE10A oraz PDE1C .....	52
4.1.3	Wybór związków do badań <i>in vivo</i> na podstawie analizy <i>in silico</i> .....	54
4.1.4	Badania stabilności metabolicznej .....	55
4.1.5	Selekcja związku wiodącego na podstawie badań <i>in vivo</i> .....	56
4.2	Charakterystyka związku wiodącego CPL500036.....	63
4.2.1	Farmakokinetyka .....	64
4.2.2	Farmakodynamika .....	70
5	DYSKUSJA .....	78
5.1	Badania przesiewowe w poszukiwaniu nowego inhibitora PDE10A.....	78
5.2	Badania nad charakterystyką związku wiodącego CPL500036 .....	82
5.2.1	CPL500036 jest związkiem biodostępnym, z dawkozależną ekspozycją i skutecznie penetrującym barierę krew-mózg .....	82
5.2.2	Podanie CPL500036 prowadzi do wzrostu stężenia cyklicznych nukleotydów w prążkowiu i aktywacji genów wczesnej odpowiedzi. ....	85
5.3	Ograniczenie zastosowanych metod.....	89
5.4	Podsumowanie i perspektywy .....	92
6	WNIOSKI.....	94
7	BIBLIOGRAFIA.....	95
8	PUBLIKACJE DOKTORANTA .....	104
9	SPIS RYCIN .....	106
10	SPIS TABEL.....	107
11	ZAŁĄCZNIK.....	108

## STRESZCZENIE

Schizofrenia stanowi znaczne obciążenie dla pacjentów, społeczeństw oraz systemów opieki zdrowotnej. Dostępne terapie w głównej mierze łagodzą jedynie objawy wytwórcze wywołując przy tym liczne skutki uboczne, a duża część pacjentów wykazuje ograniczoną odpowiedź na leczenie. Istnieje więc silna potrzeba opracowania leków o nowym mechanizmie działania. Cykliczne nukleotydy są ważnym, wtórnym przekaźnikiem sygnałowym zależnym od aktywacji białek G, które są hydrolizowane przez fosfodiesterazy. Fosfodiesteraza 10A (PDE10A) ulega selektywnej ekspresji w średnich neuronach kolczastych w prążkowie i poprzez hydrolizę zarówno cAMP jak i cGMP wpływa na intensywność i długość trwania przekaźnictwa sygnałowego. Ze względu na powiązanie szeregu schorzeń o podłożu psychiatrycznym i neurologicznym z zaburzeniami czynności prążkowie, zahamowanie aktywności PDE10A stanowi potencjalny cel interwencji farmakologicznej.

Głównym celem niniejszej pracy była selekcja innowacyjnego, drobnocząsteczkowego inhibitora PDE10A oraz scharakteryzowanie go pod kątem właściwości farmakokinetycznych i farmakodynamicznych.

W wyniku przeprowadzonych badań przesiewowych zidentyfikowano kandydata na lek CPL500036. Testy enzymatyczne *in vitro* wykazały, że charakteryzuje się on wysoką aktywnością względem PDE10A oraz selektywnością względem innego przedstawiciela rodziny fosfodiesteraz. Dalsze badania pozwoliły ustalić, że cząsteczka ta jest stabilna metabolicznie, a po podaniu dożołądkowym u szczurów wykazuje biodostępność ustrojową, penetruje barierę krew-mózg a w prążkowie prowadzi do zwiększonej fosforylacji GluR1. W drugiej części pracy szczegółowo scharakteryzowano CPL500036. Podania dożylnie i dożołądkowe u szczurów pozwoliły na określenie parametrów farmakokinetycznych związku potwierdzając jego wysoką biodostępność, dawkozależną ekspozycję i dobrą penetrację mózgu. Zaobserwowano również wzrost stężenia cyklicznych nukleotydów oraz wzrost ekspresji genów wczesnej odpowiedzi *in vivo* w prążkowie szczurów, którym podano inhibitor PDE10A, bez towarzyszących im zmian w innych strukturach mózgu.

Podsumowując, opisano nowy i innowacyjny inhibitor PDE10A o obiecujących właściwościach farmakologicznych. Charakterystyka CPL500036 pozwala na kontynuowanie badań przedklinicznych i klinicznych nad tą cząsteczką jako nową terapią w chorobach związanych z jądrami podstawnymi, w tym schizofrenią.

## ABSTRACT

Schizophrenia still remains a significant burden on patients, societies and healthcare systems. Current therapies focus mainly on alleviating only the positive symptoms, and, at the same time, cause numerous side effects. Furthermore, a large number of patients doesn't respond to the treatment. Due to that there is a strong medical need to develop innovative drugs with a new mechanism of action. Cyclic nucleotides are an important secondary messenger dependent on the activation of G proteins that are hydrolysed by phosphodiesterases. Phosphodiesterase 10A (PDE10A) is selectively expressed in medium spiny neurons in the striatum where it affects the intensity and duration of signalling through the regulation of cAMP and cGMP concentration. As schizophrenia and many other psychiatric and neurological disorders are linked to striatum and disturbances of its circuits, the inhibition of PDE10A activity is considered as an potential therapeutic approach.

The main aim of this study was to identify an innovative, low-molecular-weight PDE10A inhibitor and to characterize its pharmacokinetic and pharmacodynamic properties.

The lead molecule CPL500036 was selected based on the results of screening assays. The identified compound was by highly active towards PDE10A and selective against another member of the phosphodiesterase family as determined by *in vitro* enzymatic assays. CPL500036 was shown to be metabolically stable and further studies have confirmed that it is characterized by high oral bioavailability and good penetration of the blood-brain barrier in rats. Additionally, the administration of CPL500036 led to increased phosphorylation of GluR1 in the rats' striatum. In the second part of this thesis, a set of *in vivo* pharmacokinetic and pharmacodynamic experiments was performed in rats aiming at further characterisation of CPL500036. Intravenous and intragastric administrations allowed to determine the pharmacokinetic parameters confirming high bioavailability, dose-dependent exposure and good penetration into the brain. CPL500036 administration in rats resulted in an increase in the concentration of cyclic nucleotides and in the induction of expression of early response genes. Both effects were observed selectively in the striatum.

In conclusion, a novel, innovative PDE10A inhibitor with promising pharmacological properties has been identified. Characteristics of CPL500036 allows for the continuation of preclinical and clinical development of the molecule as a new potential therapy in diseases related to the basal ganglia, including schizophrenia.



## WYKAZ SKRÓTÓW

5-HT<sub>2A</sub> – (ang. *hydroxytryptamine receptor type 2A*) - receptor serotoninowy typu 2A

A<sub>2A</sub> – receptor adenozynowy typu 2A

AC – (ang. *adenylyl cyclase*) – cyklaza adenylova

ADME – (ang. *absorption, distribution, metabolism, excretion*) - wchłanianie, dystrybucja, metabolizm, wydalanie

AKAP – (ang. *A kinase anchoring protein*) – białko kotwiczące kinazę A

AMPA – kwas  $\alpha$ -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowy

ANOVA – (ang. *analysis of variance*) – analiza wariancji

AP-1 – (ang. *activator protein 1*) – czynnik transkrypcyjny, heterodimer w określonych warunkach złożony z białka c-Fos i białka z rodziny Jun

ARC – (ang. *activity-dependent cytoskeleton associated protein*) – Neuronalne białko ARC

AUC – (ang. *area under curve*) – pole powierzchni pod krzywą

BCA – (ang. *bicinchionic acid*) – kwas bicinchionowy

B/P – (ang. *brain to plasma*) – stosunek stężenia w mózgu do stężenia w osoczu

BSA – (ang. *bovine serum albumin*) – albumina surowicy bydłowej

cAMP – 3',5'-cykliczny monofosforan adenozynowy

cDNA – (ang. *complementary DNA*) – komplementarny DNA

c-Fos - (ang. *FBJ osteosarcoma protooncogene*) – białko c-Fos

cGMP - 3',5'-cykliczny monofosforan guanylowy

CHRM<sub>4</sub> – (ang. *muscarinic acetylcholine receptor M4*) – receptor muskarynowy typu 4

Cl<sub>int</sub> – klirens wewnętrzny

Cl<sub>tot</sub> – klirens całkowity

C<sub>max</sub> – stężenie maksymalne

CNG – (ang. *cyclic nucleotide-gated ion channels*) – kanał jonowy aktywowany przez cykliczne nukleotydy

Cp<sub>0</sub> – stężenie początkowe

CREB – (ang. *cAMP response element-binding protein*) – białko wiążące się do sekwencji CRE

D<sub>1</sub> – receptor dopaminowy typu 1

D<sub>2</sub> – receptor dopaminowy typu 2

DARPP-32 (ang. *dopamine- and cAMP-regulated neuronal phosphoprotein*) – białko regulowane przez dopaminę i cAMP

DMSO – dimetylosulfotlenek

EDTA – kwas etylenodiaminotetraoctowy

EGR-1 – (ang. *early growth response protein 1*) – białkowy czynnik odpowiedzi na wczesny wzrost 1

ELISA – (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*) – test immunoenzymatyczny

EPAC – (ang. *exchange protein activated by cAMP*) – białkowy czynnik wymiany nukleotydów guaninowych aktywowany przez cAMP

ERK (ang. *extracellular signal-regulated kinase*) – kinaza regulowana przez czynniki zewnątrzkomórkowe

F – biodostępność

GABA – (ang. *γ-aminobutyric acid*) – kwas  $\gamma$ -aminomasłowy

GC – (ang. *guanyl cyclase*) – cyklaza guanylowa

GluR1 – (ang. *amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor, glutamate receptor 1*) – podjednostka 1 receptora glutaminianu

GPe – (łac. *globus pallidus external*) – gałka biała zewnętrzna

GPI/SNpr – (łac. *globus pallidus internal/substantia nigra pars reticulata*) – gałka biała przyśrodkowa, istota czarna część siateczkowata

HRP – (ang. *horseradish peroxidase*) – peroksydaza chrzanowa

IC<sub>50</sub> – (ang. *half-maximal inhibitory concentration*) - stężenia związku, przy którym aktywność enzymu jest hamowana w połowie

IEG – (ang. *immediate early genes*) – geny wczesnej odpowiedzi

iv – (ang. *intravenous*) – dożylnie

k<sub>el</sub> – stała eliminacji

K<sub>M</sub> – stała Michaelisa-Menten

LC-MS – chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas

L-DOPA – (ang. *L-3,4-dihydroxyphenylalanine*) – L-3,4-dihydroksyfenyloalanina, lewodopa

MMP-9 (ang. *matrix metalloproteinase 9*) – metaloproteaza 9 macierzy zewnątrzkomórkowej

MPO – (ang. *multiparameter optimization*) – wieloparametrowa optymalizacja

MSK1/2 – (ang. *mitogen- and stress-activated kinases 1 and 2*) – kinaza aktywowana mitogenami i stresem 1 i 2

MSN – (ang. *medium spiny neurons*) – średnie neurony kolczaste

m/z – stosunek masy do ładunku

NAcc – (łac. *nucleus accumbens*) – jądro półleżące

NMDA – kwas N-metylo-D-asparaginowy

NO – tlenek azotu

nNOS – (ang. *neronal nitric oxide synthase*) – neuronalna syntaza tlenu azotu

NPAS4 – (ang. *Neuronal PAS Domain Protein 4*) – neuronalne białko domeny PAS4

NR2B – (ang. *N-methyl D-aspartate receptor subtype 2B*) – podjednostka NR2B receptora NMDA

PSD95 – (ang. *postsynaptic density protein 95*) – białko gęstości postsynaptycznej 95

RASGRP2 – (ang. *RAS guanyl-releasing protein 2*) – białko uwalniające nukleotydy guanylowe z białka RAS

RPS6 – (ang. *ribosomal protein S6*) – białko rybosomalne S6

qRT-PCR – (ang. *quantitative real-time polymerase chain reaction*) – ilościowa łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym

PBS – (ang. *phosphate buffered saline*) – sól fizjologiczna buforowana fosforanem

PDE – (ang. *phosphodiesterase*) – fosfodiesteraza

PKA – (ang. *protein kinase A*) – kinaza białkowa A

PKG – (ang. *protein kinase G*) – kinaza białkowa G

po – (łac. *per os*) – dożołądkowo

PP1 – (ang. *protein phosphatase 1*) – fosfataza białkowa 1

PP2A – (ang. *protein phosphatase 2A*) – fosfataza białkowa 2A

RSK1/2 – (ang. *ribosomal S6 kinase 1 and 2*) – rybosomalna kinaza S6 1 i 2

S6K – (ang. *S6 kinase*) – kinaza białka S6

SD – (ang. *standard deviation*) – odchylenie standardowe

SDS – (ang. *sodium dodecyl sulphate*) – dodecylosiarczan sodu

SDS-PAGE – (ang. *SDS-polyacrylamide gel electrophoresis*) – elektroforeza białek w żelu poliakryloamidowym, prowadzona w warunkach denaturujących

STN – (łac. *subthalamus nucleus*) – jądro niskowzgórzowe

$t_{1/2}$  – czas połowicznej eliminacji

TCA – kwas trichlorooctowy

TIMP-1 – (ang. *tissue inhibitor of metalloproteinases 1*) tkankowy inhibitor metaloproteaz 1

$t_{max}$  – czas osiągnięcia stężenia maksymalnego

TBS – (ang. *Tris-buffered saline*) – sól fizjologiczna buforowana za pomocą Tris

TBS-T – (ang. *Tris-buffered saline – Tween*) sól fizjologiczna buforowana za pomocą Tris z Tween 20

Tris – 2-amino-2-hydroksymetylo-propanodiol

$V_D$  – objętość dystrybucji

# 1 WSTĘP

## 1.1 Schizofrenia

Schizofrenia należy do jednych z najpoważniejszych i najbardziej stygmatyzujących schorzeń układu nerwowego, charakteryzujących się występowaniem objawów psychotycznych, zaburzeniami myślenia i postrzegania. Symptomy choroby można podzielić na grupy objawów pozytywnych, negatywnych oraz poznawczych (Kahn *i in.*, 2015; Gałecki i Szulc, 2018). Objawy pozytywne, tak zwane wytwórcze, obejmują urojenia, halucynacje, głosy omamowe, echo myśli. Objawy negatywne wynikają z ograniczonych czynności i aktywności psychicznych manifestujących się w postaci stępienia uczuciowego, awolucji, alogii, apatii lub anhedonii. Trzecią grupę symptomów tworzą objawy poznawcze, do których zalicza się między innymi problemy z koncentracją, pamięcią krótko- i długotrwałą, funkcjami wykonawczymi czy szybkością procesowania (van Os i Kapur, 2009).

Szacuje się, że aktualnie na schizofrenię choruje 20 milionów ludzi na świecie (James *i in.*, 2018). W Polsce liczba osób ze zdiagnozowaną schizofrenią wynosi około 185 tysięcy osób (Narodowy Fundusz Zdrowia, 2018). Epidemiologia schizofrenii pozostaje niezmienna na przestrzeni lat (Jablensky, 1999). Chorobowość wynosi 0,3-0,66 przypadków na 1000 osób, natomiast zapadalność to 15,2 przypadków na 100 000 osób na rok. Ze względu na liczne negatywne skutki społeczne i ekonomiczne schizofrenii, choroba ta należy do jednych z najbardziej kosztownych na świecie, a przykładowo w Europie jej koszty szacuje się na kwotę prawie 94 miliardów Euro rocznie (Howes *i in.*, 2015).

Podstawową metodą leczenia schizofrenii są środki farmakologiczne. Chorzy mają do dyspozycji leki antypsychotyczne pierwszej generacji – tzw. neuroleptyki typowe, oraz drugiej generacji – tzw. neuroleptyki atypowe. Mechanizm działania leków antypsychotycznych pierwszej generacji, do których należą haloperidol czy chlorpromazyna, opiera się na antagonizmie do receptora dopaminowego typu 2 (D2). Druga generacja leków to substancje oddziałujące z wieloma receptorami jednocześnie, ze szczególnym uwzględnieniem receptora serotoninowego typu 2A (5-HT<sub>2A</sub>) oraz receptora D2. Do tej grupy leków zalicza się m.in. klopazinę, rysperydon, olanzapinę czy lurasydon. Obie dostępne grupy leków mają jednak szereg ograniczeń (Jaeschke *i in.*, 2016). 20-30% pacjentów wykazuje brak odpowiedzi a kolejne 30% jedynie umiarkowaną odpowiedź na zastosowane leczenie (Steeds *i in.*, 2015). Dodatkowo leki pierwszej generacji, poprzez wysoką efektywną blokadę

receptorów D2 powodują często niepożądane efekty uboczne w postaci efektów pozapiramidowych (np. katalepsji) czy hiperprolaktynemii (Huhn *i in.*, 2019). Leki drugiej generacji powstały głównie w odpowiedzi na potrzebę ograniczenia wspomnianych skutków ubocznych i choć w mniejszym stopniu powodują polekowe efekty pozapiramidowe, ich zastosowanie wiąże się często z pojawieniem się syndromu metabolicznego, na który składają się cukrzyca, nadwaga i dyslipidemia (Pillinger *i in.*, 2020). Dla przedstawicieli obu klas leków obserwuje się również niepożądany wpływ na układ sercowo-naczyniowy, m.in. poprzez wydłużenie odcinka QT w zapisie elektrokardiograficznym, co może prowadzić do zagrażających życiu zaburzeń rytmu serca (Krebs *i in.*, 2006). Wybrane neuroleptyki mogą także prowadzić do leukopenii czy agranulocytozy. Lekooporność oraz efekty niepożądane skutkują nieprzestrzeganiem zaleceń dotyczących terapii aż 50% pacjentów (Flanagan i Dunk, 2008). Ponadto dostępne aktualnie terapie wpływają przede wszystkim na objawy pozytywne w schizofrenii nie wywierając lub mając bardzo ograniczony efekt na domenę negatywną i poznawczą, a przede wszystkim te grupy objawów wykluczają samodzielne funkcjonowanie pacjenta (Szulc i Samochowiec, 2019).

Podsumowując, istnieje silne zapotrzebowanie na opracowanie leków o nowym mechanizmie działania w terapii schizofrenii, które mogłyby znaleźć zastosowanie w przypadku pacjentów nieodpowiadających na dotychczasowe leczenie, a także skuteczniej odwracałyby objawy negatywne i poznawcze oraz wywoływały mniej efektów niepożądanych.

## **1.2 Hipoteza dopaminowa i glutaminianowa jako podłoże molekularne schizofrenii**

Dwie wiodące hipotezy dotyczące patofizjologii schizofrenii to hipoteza dopaminowa oraz glutaminianowa (Howes i Murray, 2014; McCutcheon *i in.*, 2020). Teoria oparta na nadmiernym stężeniu dopaminy została sformułowana w latach 70-tych ubiegłego wieku i opierała się na obserwacji, iż antagoniści receptorów D2 działają antypsychotycznie (Andén *i in.*, 1970) oraz że amfetamina, która prowadzi do wzrostu dopaminy w szczelinach synaptycznych, może powodować objawy psychozy odpowiadające tym występującym w schizofrenii (Bell, 1973). Najnowsze badania wykazały, że dysfunkcja przekaźnictwa dopaminowego wynika z nadmiernej syntezy dopaminy, jej uwalniania i zwiększonego stężenia w szczelinach synaptycznych, natomiast nie koreluje ze zmianami w ekspresji receptora D2 czy dostępności transportera dopaminy (Howes *i in.*, 2012).

W warunkach fizjologicznych dopamina pośredniczy w przypisywaniu odpowiedniej istotności otrzymywanym bodźcom, nie jest natomiast odpowiedzialna za kreowanie tego procesu. W warunkach patologicznych – podczas psychozy, będącej jednym z symptomów schizofrenii, dochodzi do uwalniania nadmiernej ilości dopaminy niezależnie od bodźca. To nieprawidłowe przekąźnictwo dopaminergiczne prowadzi do fałszywego przypisania istotności bodźcom czy obiektom, które w innych warunkach byłyby ignorowane (Kapur, 2003). Rozwój psychozy trwa wiele lat, prowadząc do umacniania i nadawania kontekstu urojeniom czy halucynacjom. Ten proces związany jest również z samoistnym utrzymywaniem się nieprawidłowej aktywności dopaminergicznej, w której błędnie przypisanie istotności nieodpowiednim bodźcom prowadzi do ciągłej stymulacji układu dopaminergicznego (Saunders *i in.*, 2018).

Strukturą mózgu, która odgrywa centralną rolę w procesowaniu przekąźnictwa dopaminergicznego, jest prądkowie. Postępy w technikach obrazowania układu nerwowego pozwoliły wykazać, że najsilniejsze zmiany związane z dysfunkcją dopaminy obserwuje się w prądkowiu grzbietowo-przyśrodkowym (prądkowie asocjacyjne), które odpowiada za wyższe procesy poznawcze oraz ich wykonywanie (Kegeles *i in.*, 2010; McCutcheon *i in.*, 2018). Dysfunkcja przekąźnictwa dopaminergicznego w prądkowiu odpowiedzialna jest również za dalsze symptomy schizofrenii takie jak poczucie braku sprawczości, echo myśli czy urojenia słuchowe (McCutcheon *i in.*, 2019). Ponadto, w schizofrenii obserwuje się zmniejszoną liczbę połączeń nerwowych pomiędzy korą mózgową a grzbietowo-przyśrodkową częścią prądkowia (Fornito *i in.*, 2013). Postuluje się, że ta nieprawidłowość prowadzi do zaburzenia procesów myślowych, emocjonalnych oraz zachowań skutkując m.in. nieodpowiednim afektem.

Nadmierna aktywność dopaminergiczna jest również łączona z pozostałymi grupami objawów: negatywnymi i poznawczymi. Szereg badań wykazał, że objawy negatywne mogą wynikać z dysfunkcji układu nagrody, którego główną komponentą jest dopamina (Haber i Knutson, 2010; Strauss *i in.*, 2011; Gold *i in.*, 2012; Maia i Frank, 2017). Postuluje się również, że zmniejszone uwalnianie dopaminy w korze mózgowej wynikać może z nadmiernego stężenia dopaminy w prądkowiu (Simpson *i in.*, 2010). Prowadzi to do zaburzeń poznawczych, które mają charakter długotrwały i utrzymują się nawet po unormowaniu funkcji dopaminy w prądkowiu (Howes i Murray, 2014).

Nie wszystkie pytania związane z mechanizmem powstawania symptomów negatywnych i poznawczych czy zmianami w strukturze mózgu obserwowanymi w czasie

choroby znajdują swoją odpowiedź w oparciu jedynie o rolę dopaminy w etiopatologii schizofrenii. Hipoteza wskazująca na rolę glutaminianu i jego receptora N-metylo-D-asparaginowego (NMDA) w przebiegu schizofrenii została sformułowana w latach 90-tych ubiegłego wieku (Olney i Farber, 1995). Opierała się na obserwacji, że podanie antagonistów receptora NMDA (np. fencyklidyny i ketaminy) powoduje objawy silnie przypominające te występujące w schizofrenii: halucynacje, urojenia, zaburzenia myśli, a co najważniejsze, również symptomy negatywne (Krystal i in., 1994). Ponadto zaobserwowano, że podanie antagonistów receptora NMDA skutkuje zmianami neurodegeneracyjnymi w korze mózgowej pokrywającymi się z tymi obserwowanymi w schizofrenii, które mogą prowadzić do powstawania symptomów schizofrenii (Olney i Farber, 1995).

W związku z powyższym, opracowanie innowacyjnych leków o nowym mechanizmie działania opartym o regulację ścieżek sygnałowych zależnych od sygnałów dopaminergicznych i glutaminianergicznych może stanowić skuteczne podejście terapeutyczne w leczeniu schizofrenii.

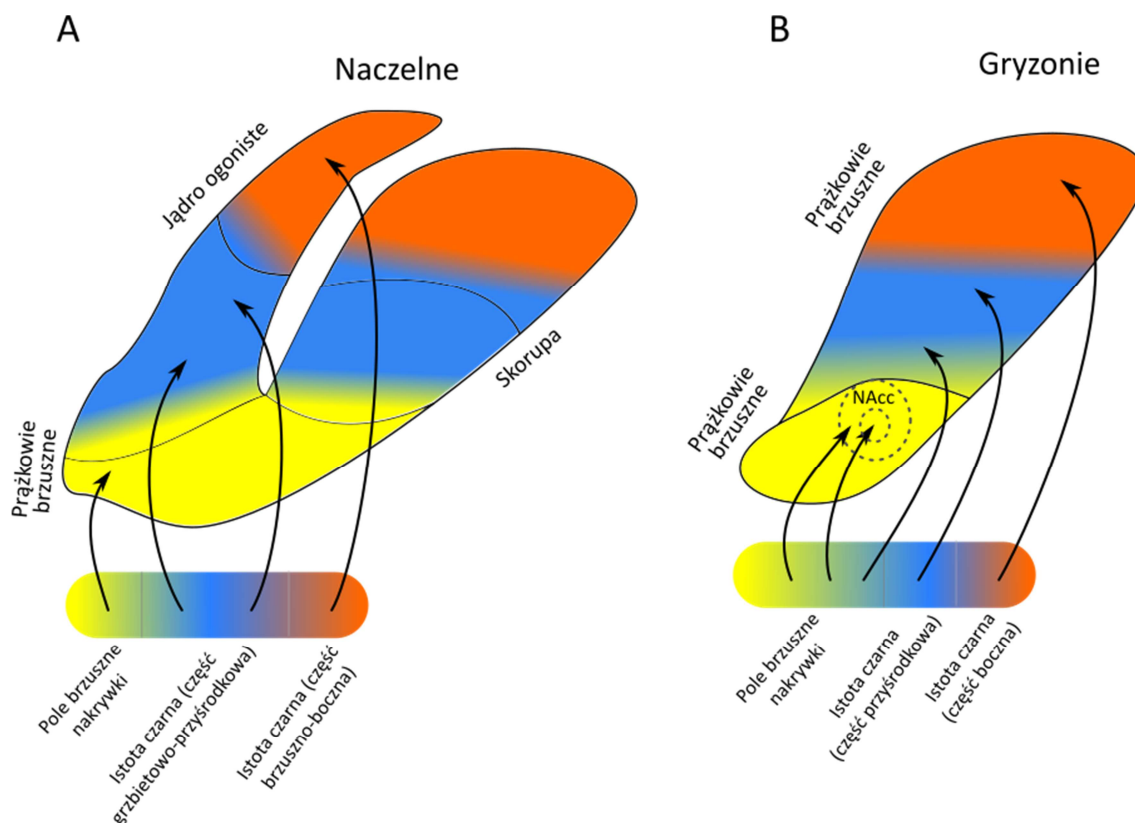
## **1.3 Prążkowie**

### **1.3.1 Budowa prążkowie**

Prążkowie jest strukturą, która w głównej mierze integruje i procesuje sygnały dopaminergiczne pochodzące z istoty czarnej i pola brzusznej nakrywki oraz sygnały glutaminianergiczne z kory mózgowej (Surmeier *i in.*, 2007). Prążkowie jest częścią jąder podstawnych, w których skład wchodzi również takie struktury jak gałka biała, istota czarna oraz jądro niskowzgórzowe. Jądra podstawne są odpowiedzialne za selekcję, koordynowanie i przekazywanie sygnałów otrzymywanych z kory mózgowej dotyczących m.in. ruchów, istotności otrzymywanych informacji czy też funkcji poznawczych. Powyższy proces można przyrównać do filtrowania otrzymanych bodźców, które są modulowane na podstawie informacji kontekstowych i w efekcie przypisywany im jest odpowiedni poziom istotności (Hunnicutt *i in.*, 2016). Mimo braku wyraźnych różnic anatomicznych w budowie prążkowie, projekcje korowo-prążkowe pozwalają podzielić tę strukturę na trzy części: brzuszna – limbiczną, grzbietowo-przyśrodkową – asocjacyjną oraz grzbietowo-boczną – sensomotoryczną (Alexander i Crutcher, 1990).

Neurony w części sensomotorycznej i asocjacyjnej prążkowie mogą być stymulowane przez neurony dopaminergiczne istoty czarnej, natomiast neurony w części brzusznej

prążkowa stymulowane są przez neurony pola brzusznego nakrywki. Schemat połączeń pomiędzy prążkiem a śródmózgiem u naczelnych i gryzoni, mimo różnic anatomicznych, przebiega w podobny sposób (Rycina 1).

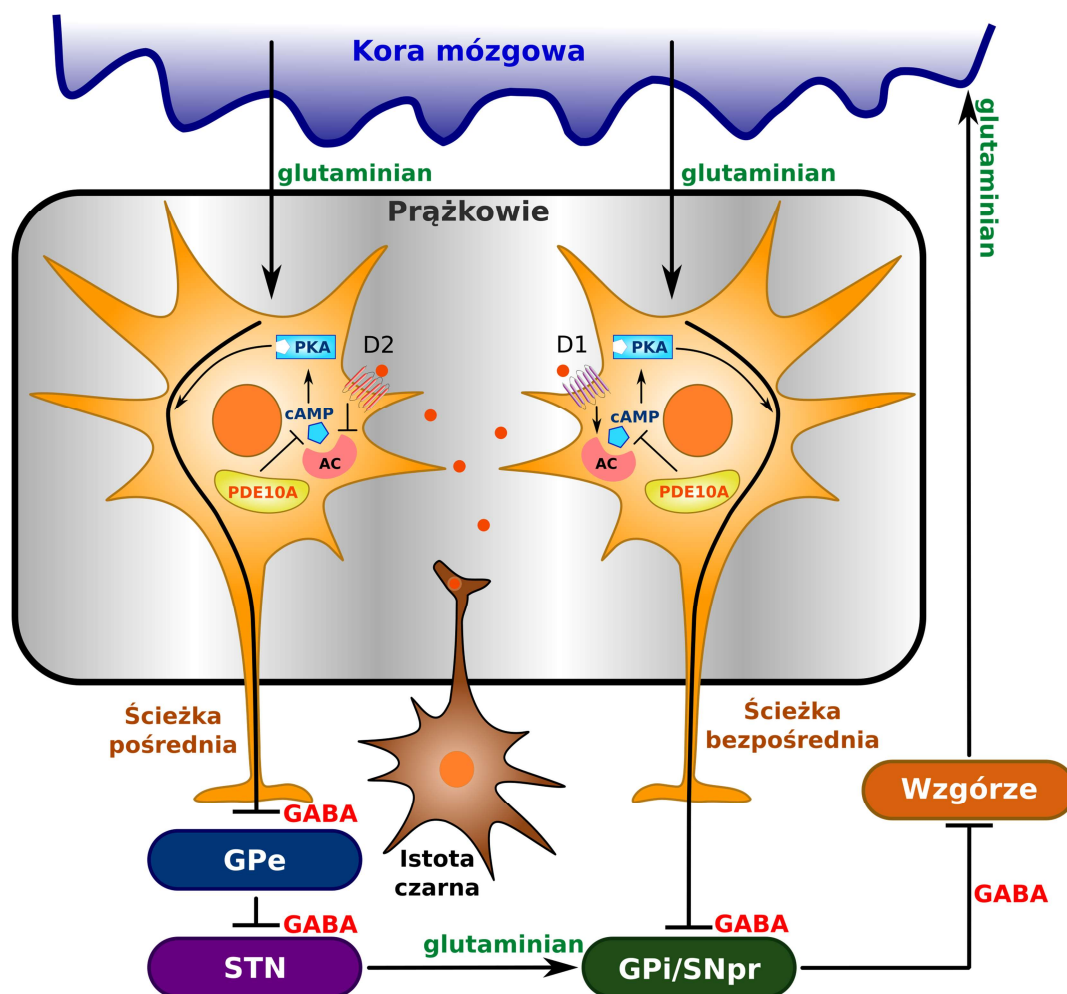


Rycina 1 **Schemat połączeń nerwowych prążkowie ze śródmózgiem u naczelnych i gryzoni** A) U naczelnych pole brzuszne nakrywki unerwia część brzuszną prążkowie. Część grzbietowo-przyśrodkowa istoty czarnej unerwia część grzbietowo-przyśrodkową prążkowie (prążkowie asocjacyjne). Istota czarna brzuszno-boczna unerwia natomiast część sensomotoryczną prążkowie. B) Część przyśrodkowa pola brzusznego nakrywki, które jest proporcjonalnie większe u gryzoni niż u naczelnych, unerwia skorupę, natomiast część środkowa rdzeń jądra półleżącego. Region homologiczny do asocjacyjnej części prążkowie u naczelnych jest unerwiany przez część grzbietową pola brzusznego nakrywki oraz przez istotę czarną. NAcc – jądro półleżące (łac. *nucleus accumbens*). Na podstawie McCutcheon *i in.*, 2019.



### 1.3.2 Średnie neurony kolczaste

Prążkowie zbudowane jest przede wszystkim z GABAergicznych średnich neuronów kolczastych (ang. *medium spiny neurons*, MSN) stanowiących ponad 90% neuronów w prążkowie. Pozostałą grupę stanowią interneurony: GABAergiczne i cholinergiczne (Kreitzer, 2009). Średnie neurony kolczaste dzielą się na dwie grupy, które tworzą dwie ścieżki projekcji do dalszych jąder podstawy (Rycina 2) (Nishi i Snyder, 2010). Neurony budujące tzw. ścieżkę bezpośrednią mają projekcję do części wewnętrznej gałki bladej oraz do istoty czarnej siateczkowatej, które kolejno posiadają GABAergiczne połączenie do wzgórza pobudzającego korę za pomocą synaps glutaminianergicznych. Aktywacja średnich neuronów kolczastych w tej ścieżce powoduje zahamowanie aktywności neuronów w gałce bladej i istocie czarnej, co prowadzi do braku sygnału hamującego do wzgórza, uzyskując pobudzający efekt w korze mózgowej. Natomiast w ścieżce pośredniej średnie neurony kolczaste posiadają projekcję do części zewnętrznej gałki bladej, która na drodze połączeń GABAergicznych hamuje jądro niskowzgórzowe, które z kolei pobudza część wewnętrzną gałki bladej oraz istotę czarną siateczkowatą ostatecznie zmniejszając aktywność wzgórza, które nie pobudza kory mózgowej. Należy jednak zaznaczyć, że wyraźny podział na ścieżkę pośrednią i bezpośrednią nie dotyczy neuronów zlokalizowanych w brzusznej części prążkowie (Smith, Lobo *i in.*, 2013). Średnie neurony kolczaste w obu ścieżkach nie tylko różnią się unerwieniem struktur, ale i charakterystyką biochemiczną i funkcjonalną, pozwalającą im na odmienne procesowanie otrzymywanych bodźców (Castro *i in.*, 2013). W średnich neuronach kolczastych ścieżki bezpośredniej specyficznej ekspresji ulegają receptory dopaminowe typu 1 (D1), receptory muskarynowe typu 4 (CHRM4) oraz neuropeptydy: substancja P oraz dynorfina (Gerfen *i in.*, 1990; Gerfen i Surmeier, 2011). Natomiast w neuronach ścieżki pośredniej ekspresji ulegają receptory D2, receptory adenozynowe A2A jak i neuropeptyd enkafalina (Gerfen *i in.*, 1990; Gerfen i Surmeier, 2011).



Rycina 2 Ścieżki pośrednia i bezpośrednia w prążkowie procesują sygnały w przeciwstawny sposób. Średnie neurony kolczaste budujące tzw. ścieżkę bezpośrednią unerwiają część wewnętrznej gałki bladej oraz istotę czarną siateczkowatą (łac. *globus pallidus internal/substantia nigra pars reticulata*, GPi/SNpr), które kolejno posiadają GABAergiczne połączenie do wzgórza pobudzającego korę za pomocą synaps glutaminianergicznych. Aktywacja średnich neuronów kolczastych w tej ścieżce powoduje zahamowanie neuronów w gałce bladej i istocie czarnej, co prowadzi do braku sygnału hamującego do wzgórza, uzyskując pobudzający efekt w korze mózgowej. Aktywacja receptorów D1 (D1), ulegających ekspresji w średnich neuronach kolczastych ścieżki bezpośredniej, powoduje wzrost aktywności cykazy adenylowej (AC). Natomiast w ścieżce pośredniej średnie neurony kolczaste unerwiają części zewnętrzne gałki bladej (łac. *globus pallidus external*, GPe), która na drodze połączeń GABAergicznych hamuje jądro niskowzgórzowe (łac. *subthalamus nucleus*, STN), które z kolei może pobudzać część wewnętrznej gałki bladej oraz istotę czarną siateczkowatą. W efekcie aktywacja ścieżki pośredniej skutkuje zmniejszeniem aktywności wzgórza, które nie pobudza kory mózgowej. Pobudzenie receptorów D2 (D2), ulegających ekspresji w średnich neuronach kolczastych ścieżki pośredniej, hamuje aktywność cykazy adenylowej. Na podstawie Nishi i Snyder, 2010.

### 1.3.3 Kaskada sygnałowa zależna od dopaminy i cyklicznych nukleotydów

Receptory D1 sprzężone są ze stymulującą podjednostką  $\alpha$  białka G ( $G\alpha_{s/olf}$ ), co w przypadku aktywacji receptorów D1 prowadzi do wyższej aktywności cyklazy adenylowej (ang. *adenylyl cyclase*, AC) (Corvol *i in.*, 2001). Odwrotna sytuacja występuje w neuronach ścieżki pośredniej, w której receptory D2 sprzężone są z hamującą podjednostką  $\alpha$  białka G ( $G\alpha_{i/o}$ ). Aktywacja tych receptorów prowadzi do zahamowania aktywności cyklazy adenylowej. W ten sposób uwolnienie dopaminy skutkuje zwiększonym stężeniem 3',5'-cyklicznego monofosforanu adenozynowego (cAMP) w neuronach ścieżki bezpośredniej, aktywując je, w przeciwieństwie do neuronów ścieżki pośredniej, gdzie poprzez niższą syntezę cAMP, dochodzi do zmniejszonej aktywności neuronów.

Dopamina ma również wpływ na syntezę 3',5'-cyklicznego monofosforanu guanylowego (cGMP) (West i Tseng, 2011). W przeciwieństwie do cAMP, w regulacji stężenia cGMP biorą udział interneurony. Za syntezę cGMP odpowiedzialna jest cyklaza guanylowa (ang. *guanyl cyclase*, GC), która stymulowana jest przez tlenek azotu (ang. *nitric oxide*, NO). NO powstaje w głównej mierze w wyniku syntezy przez neuronalną syntazę tlenu azotu (ang. *neronal nitric oxide synthase*, nNOS), która ulegają ekspresji w interneuronach. Dyfuzja NO do średnich neuronów kolczastych powoduje aktywację GC i syntezę cGMP (West i Tseng, 2011). Wykazano również wpływ receptorów dopaminowych na aktywność GC. Stymulacja receptorów D1 powoduje wzrost stężenia cGMP, natomiast antagonizowanie ich działania powoduje spadek stężenia cGMP w prążkowie (Sammut *i in.*, 2006). Sytuacja w przypadku receptorów D2 kształtuje się odwrotnie - w przypadku antagonizowania ich działania stężenie cGMP wzrasta (Sammut *i in.*, 2007). Stymulowanie receptorów D2 nie prowadzi jednak do zmian poziomu tego przekaźnika komórkowego (Altar *i in.*, 1990).

Kaskada sygnałowa zależna od cyklicznych nukleotydów, indukowana przez dopaminę w MSN, jest częścią tzw. wolnej transmisji synaptycznej, której efekty trwają od setek milisekund do godzin prowadząc do długofalowej adaptacji procesów komórkowych do zmieniających się warunków (Greengard, 2001). Zwiększone stężenia cAMP oraz cGMP regulują aktywność szeregu białek efektorowych w tym przede wszystkim kinazy białkowej A (ang. *protein kinase A*, PKA) i kinazy białkowej G (ang. *protein kinase G*, PKG) jak i również białkowego czynnika wymiany nukleotydów guaninowych aktywowany przez cAMP (ang.

*exchange protein activated by cAMP*, EPAC) czy kanałów jonowych aktywowanych przez cykliczne nukleotydy (ang. *cyclic nucleotide-gated ion channel*, CNG).

PKA i PKG są kluczowymi elementami w transdukcji sygnału zależnego od cyklicznych nukleotydów. Ich aktywacja następuje poprzez oddysocjowanie podjednostek regulatorowych w odpowiedzi na wysokie stężenie cAMP i cGMP. Uwolnione jednostki katalityczne fosforylują szereg substratów białkowych. W średnich neuronach kolczastych do kluczowych należą: DARPP-32 (ang. *dopamine- and cAMP-regulated neuronal phosphoprotein*), PP2A (ang. *protein phosphatase 2A*), CREB (ang. *cAMP response element-binding protein*), podjednostka receptora AMPA – GluR1 (ang. *amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor, glutamate receptor 1*), a także podjednostka receptora NMDA – NR2B (ang. *N-methyl D-aspartate receptor subtype 2B*), RASGRP2 (ang. *RAS guanyl-releasing protein 2*) czy RPS6 (ang. *ribosomal protein S6*) (Greengard *i in.*, 1999; Nagai *i in.*, 2016).

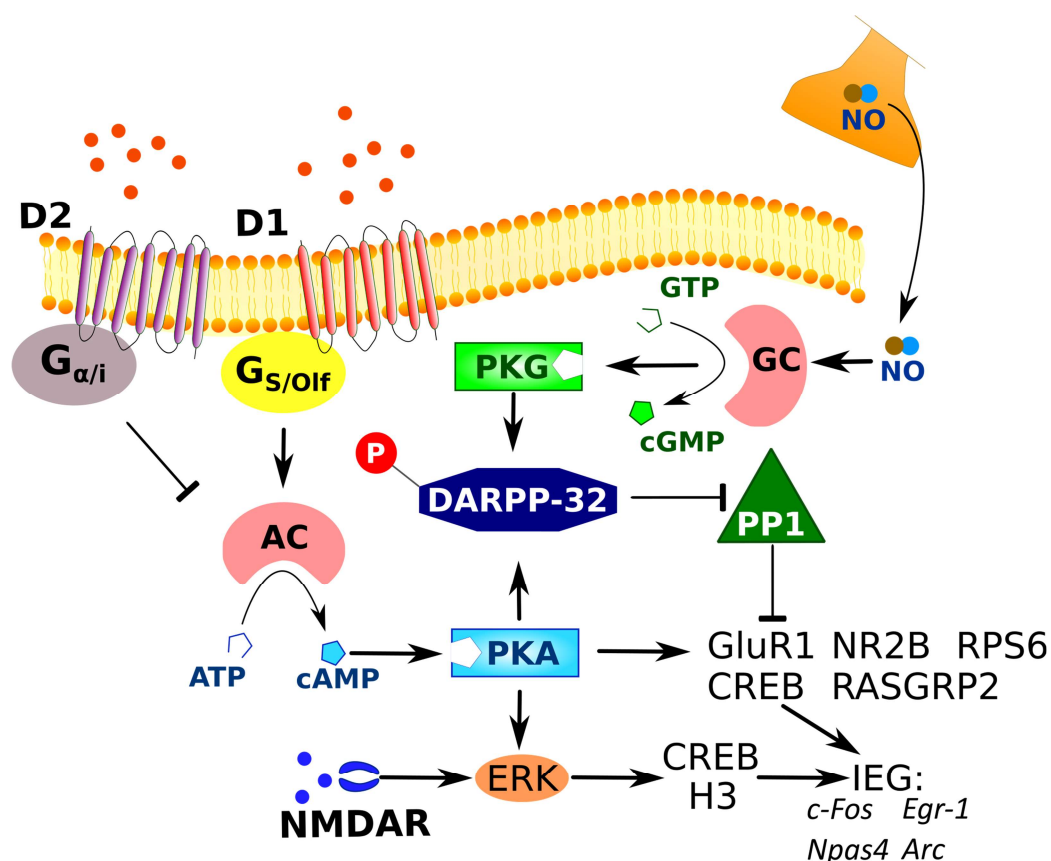
DARPP-32 ulega wysokiej ekspresji w średnich neuronach kolczastych prądkowia należąc do najważniejszych substratów PKA i PKG oraz pełni centralną rolę w ścieżce sygnałowej opartej na cyklicznych nukleotydach (Ouimet *i in.*, 1998; Fernandez *i in.*, 2006). PKA i PKG fosforylują DARPP-32 na treoninie w pozycji 34, co w efekcie silnie hamuje aktywność fosfatazy białkowej 1 (ang. *protein phosphatase 1*, PP1). PP1 jest przedstawicielem fosfataz serynowo-treoninowych i posiada bardzo szeroki zakres specyficzności substratowej wliczając to w białka fosforylowane przez PKA oraz PKG. Do jej substratów należą kanały jonotropowe (np. receptor AMPA oraz NMDA), kanały jonowe bramkowane napięciem, pompy jonowo-potasowe, kanały wapniowe czy czynniki transkrypcyjne (takie jak białko CREB) (Greengard *i in.*, 1999). Inhibicja PP1 przez DARPP-32 potęguje efekty aktywowanych PKA oraz PKG (Hemmings *i in.*, 1984).

DARPP-32 może również ulegać translokacji do jądra w efekcie defosforylacji seryny w pozycji 97 przez PP2A. W jądrze DARPP-32 fosforyluje histon H3 (Stipanovich *i in.*, 2008), który oddysocjowuje od heterochromatyny rozluźniając jej strukturę i umożliwiając transkrypcję wybranych genów (Johansen i Johansen, 2006).

Ten proces jest wzmacniany w przypadku równoczesnej stymulacji receptora glutaminianu NMDA oraz receptora dopaminowego D1. Aktywacja receptora NMDA skutkuje napływem jonów wapnia i dalszą aktywacją ścieżki sygnałowej opartej na RAS/RAF/MEK i fosforylacji ERK. Wraz z aktywnością PKA oraz zahamowaniem PP1 prowadzi to akumulacji

ufosforylowanego ERK w jądrze. Skutkuje to aktywowaniem szeregu kinaz w tym: rybosomalnej kinazy S6 1 i 2 (*ang. ribosomal S6 kinases 1 and 2, RSK1/2*), kinazy aktywowanej mitogenami i stresem 1 i 2 (*ang. mitogen- and stress-activated kinases 1 and 2, MSK1/2*). W rezultacie następuje fosforylacja histonu H3 oraz białka CREB (Hagiwara *i in.*, 1992; Stipanovich *i in.*, 2008).

W wyniku powyższych procesów, a przede wszystkim fosforylacji białka H3 i białka CREB, dochodzi do rozpoczęcia transkrypcji genów wczesnej odpowiedzi (*ang. immediate early genes, IEG*), w tym *c-Fos, Npas4, Egr-1, Arc* (Gentzel *i in.*, 2015; Nakatani *i in.*, 2017). Geny wczesnej odpowiedzi są elementem pierwszej reakcji komórki na stymulację, a niektóre z nich kodują czynniki transkrypcji odpowiadające za regulację drugiej, późnej fali transkrypcji genów, kontrolując m.in. plastyczność neuronalną (Gerfen, 2000; Girault, 2012) (Rycina 3).



Rycina 3 **Ścieżka sygnałowa zależna od stężenia cyklicznych nukleotydów**. Stężenie cAMP wzrasta w wyniku aktywacji receptora dopaminowego D1 (D1R) lub antagonizowania receptora dopaminowego (D2R) poprzez aktywację cykazy adenylowej (AC). Stężenie cGMP wzrasta poprzez aktywację cykazy guanylowej (GC) podtlenkiem azotu (NO) pochodzącym z interneuronów. cAMP i cGMP aktywują odpowiednio kinazy białkowe PKA i PKG, które posiadają szereg substratów, w tym białko DARPP-32. Ufosforylowane białko DARPP-32 jest silnym inhibitorem fosfatazy białkowej 1 (PP1). Aktywność PKA łącznie z zahamowaniem aktywności PP1 skutkuje ufosforylowaniem i aktywacją szeregu białek i genów efektorowych. IEG (*ang. immediate early genes*) – geny wczesnej odpowiedzi. Na podstawie Nishi *i in.*, 2011.

## 1.4 Fosfodiesteraza 10A

### 1.4.1 Rodzina fosfodiesteraz

Fosfodiesterazy (PDE) należą do klasy enzymów hydrolaz, które hydrolizują wiązanie fosfodiesterazowe cyklicznych nukleotydów cAMP oraz cGMP rozkładając je do monofosforanowych form, AMP i GMP. Fosfodiesterazy pogrupowane zostały na podstawie sekwencji, kinetyki reakcji, regulacji i właściwości farmakologicznych w jedenaście rodzin (PDE1-11) (Conti i Beavo, 2007). Fosfodiesterazy mogą selektywnie hydrolizować cAMP (PDE4, PDE7 i PDE8), cGMP (PDE5, PDE6 i PDE9) lub oba te nukleotydy jednocześnie (PDE1, PDE2, PDE3, PDE10 i PDE11).

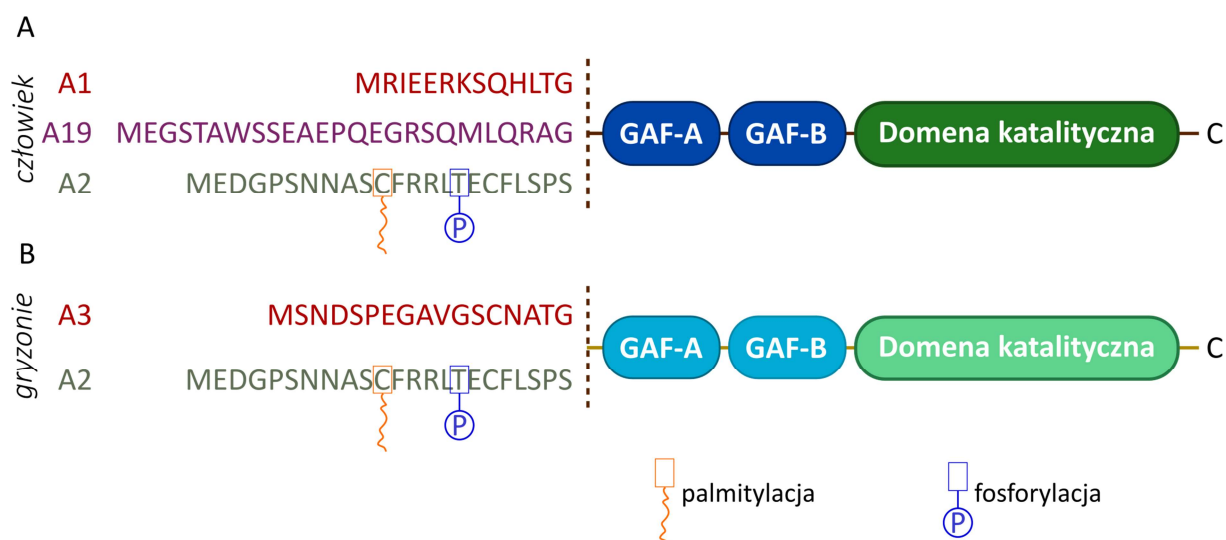
### 1.4.2 Struktura, ekspresja i rola PDE10A w przekazywaniu sygnałów w prądkowiu

Fosfodiesteraza 10A (PDE10A) została opisana po raz pierwszy w roku 1999 i należy do grupy fosfodiesteraz hydrolizujących zarówno cAMP jak i cGMP (Fujishige *i in.*, 1999; Loughney *i in.*, 1999; Soderling *i in.*, 1999). W wyniku ekspresji genu kodującego PDE10A u człowieka powstaje 29 transkryptów, z których 15 wykryto w mózgu, a najczęściej występujące izoformy tego białka to: PDE10A1, PDE10A2 oraz PDE10A19 (MacMullen *i in.*, 2016). U szczurów natomiast najczęstszymi izoformami są PDE10A1 oraz PDE10A3 (Kotera *i in.*, 2004). Białko PDE10A zbudowane jest z domeny katalitycznej, z kieszenią selektywności charakterystyczną tylko dla tej fosfodiesterazy, oraz z domen GAF (ang. *cGMP activated PDEs, adenylyl cyclase, and Fh1A*): GAF-A i GAF-B, które pełnią funkcje regulatorowe i mogą przyłączać cykliczne nukleotydy bądź odpowiadać za dimeryzację (Handa *i in.*, 2008; Chappie *i in.*, 2012) (Rycina 4). W przypadku PDE10A wykazano, że cAMP może przyłączać się do domeny GAF-B powodując 3-krotny wzrost aktywacji enzymu (Jäger *i in.*, 2012). Izofomy różnią się sekwencją na N-końcu białka. PDE10A1, PDE10A3 oraz PDE10A19 zlokalizowane są w cytozolu. Natomiast izoforma PDE10A2 jako jedyna posiada motyw CFRRLT na N-końcu białka, umożliwiając palmitylację cysteiny w pozycji 11 i zakotwiczenie enzymu w błonie komórkowej (Charych *i in.*, 2010). Komórkowa lokalizacja izoformy PDE10A2 jest kontrolowana poprzez fosforylację na treoninie w pozycji 16, która w przypadku wysokiego stężenia cyklicznych nukleotydów jest fosforylowana przez PKA prowadząc do akumulowania się enzymu w cytozolu i hydrolizy cyklicznych nukleotydów w tym kompartmentcie komórkowym (Kotera *i in.*, 2004; Charych *i in.*, 2010). W przypadku niepodwyższonego stężenia cyklicznych

nukleotydów PDE10A2 pozostaje w błonie i reguluje stężenie cyklicznych nukleotydów w tej części komórki. Wykazano, że PDE10A występuje w kompleksie białkowym zlokalizowanym postsynaptycznie w pobliżu błony komórkowej tworząc go wraz z AKAP (ang. *A kinase anchoring protein*), PKA, podjednostkami NR2A i B receptora NMDA oraz białkiem PSD95 (ang. *postsynaptic density protein 95*) (Russwurm *i in.*, 2013).

PDE10A ulega ekspresji przede wszystkim w ośrodkowym układzie nerwowym. Bardzo wysoką ekspresję, w porównaniu do innych struktur i tkanek, obserwuje się w prążkowie, w średnich neuronach kolczastych, jak i również w gałce bladej i istocie czarnej (Seeger *i in.*, 2003; Polito *i in.*, 2015). Ponadto PDE10A ulega ekspresji na nieznacznym poziomie w hipokampie, korze mózgowej, mózdzku, rdzeniu mózgowym. Ekspresja PDE10A poza ośrodkowym układem nerwowym jest bardzo niska. Białko PDE10A nie zostało wykryte w głównych organach: wątrobie, nerkach, płucach, śledzionie i sercu, mimo wykrytych transkryptów genu *PDE10A* w tych tkankach. Najwyższą immunoreaktywność wobec PDE10A poza centralnym układem nerwowym wykazano dla jąder, dodatkowo transkrypty genu wykryto w siatkówce, brązowej tkance tłuszczowej, wysepkach trzustkowych (Fujishige *i in.*, 1999; Seeger *i in.*, 2003; Coskran *i in.*, 2006; Lakics *i in.*, 2010).

PDE10A wykazuje różne wartości powinowactwa do cAMP i cGMP. cAMP wykazuje niższą wartość stałej Michaelisa-Menten ( $K_M$ ), która wynosi 0,05  $\mu\text{M}$  w porównaniu do 3,0  $\mu\text{M}$  dla cGMP (Soderling *i in.*, 1999). Jednak to dla tego drugiego nukleotydu prędkość maksymalna hydrolizy jest 4,7-krotnie wyższa sugerując bardziej specyficzną aktywność wobec cGMP. PDE10 odpowiada za 60-70% hydrolizy cAMP w MSN, mimo obecności innych fosfodiesteraz w tych komórkach, oraz w znacznie mniejszym stopniu za hydrolizę cGMP (za którą w głównej mierze odpowiada PDE1 i PDE2) (Russwurm *i in.*, 2015). Ponadto, niska wartość  $K_M$  dla cAMP skutkuje aktywnością enzymu już przy niskich stężeniach cAMP w przeciwieństwie do innych fosfodiesteraz występujących w prążkowie, których  $K_M$  jest w zakresie mikromolarnym. Wykazano, że PDE10A jako jedyna fosfodiesteraza w MSN posiada właściwość hydrolizy cAMP do poziomu stanu nieaktywnego i w efekcie jej rola jest krytyczna w przekazywaniu sygnałów w MSN (Mota *i in.*, 2021).



Rycina 4 **Schemat najważniejszych izoform PDE10A u ludzi i gryzoni.** Białko PDE10A zbudowane jest z domeny katalitycznej oraz z domen GAF-A i GAF-B (ang. *cGMP activated PDEs, adenylyl cyclase, and Fh1A*), które pełnią funkcje regulatorowe bądź odpowiadają za dimeryzację. Kolejne izoformy różnią się sekwencją na N-końcu białka. A) Najważniejszymi ludzkimi izoformami są PDE10A1, PDE10A2, PDE10A19. Izoformy PDE10A1 i PDE10A19 zlokalizowane są w cytozolu, natomiast PDE10A2, dzięki palmitylacji cysteiny w pozycji 11, może być również zakotwiczone w błonie komórkowej. Aktywacja PKA w wyniku wysokiego stężenia cAMP prowadzi do ufosforylowania PDE10A2 na treoninie w pozycji 16, co prowadzi do zmiany lokalizacji na cytozoolową. B) U szczurów najważniejszymi izoformami są PDE10A2 i PDE10A3. Izoforma A3 ma lokalizację cytozoolową, natomiast regulacja PDE10A2 jest identyczna jak u człowieka. Na podstawie Kotera *i in.*, 2004.

### 1.4.3 PDE10A jako cel interwencji farmakologicznej

Fosfodiesterazy odpowiadają za kontrolę, intensywność i długość trwania przekazywania sygnałowego opartego na cyklicznych nukleotydach, których stężenie zależy od stymulacji białek G. W związku z powyższym stały się one celem interwencji farmakologicznej w wielu schorzeniach w tym między innymi: inhibitor PDE3 milrynon w leczeniu w ostrej zastoinowej niewydolności krążenia, inhibitor PDE4 roflumilast w leczeniu przewlekłej obturacyjnej choroby płuc, inhibitory PDE5 sildenafil, tadalafil, vardenafil w leczeniu zaburzeń erekcji lub też sildenafil w leczeniu nadciśnienia płucnego (Lugnier, 2006; Menniti *i in.*, 2006; Baillie *i in.*, 2019).

Odkrycie PDE10A wiązało się ze zwróceniem uwagi na możliwość farmakologicznej regulacji jej działania (Soderling *i in.*, 1998; Fujishige *i in.*, 1999). PDE10A posiada szereg cech i właściwości, które czynią tę fosfodiesterazę atrakcyjnym celem interwencji farmakologicznej. Należą do nich: budowa białka, profil ekspresji w obrębie układu nerwowego i innych tkankach oraz rola PDE10A w przekazywaniu sygnałowym zależnym od cyklicznych nukleotydów.

Struktura PDE10A umożliwia zaprojektowanie wysoce selektywnych związków. Miejsce katalityczne enzymu, oprócz miejsc odpowiedzialnych za oddziaływanie z cAMP lub



cGMP posiada tzw. kieszeń selektywności (Verhoest *i in.*, 2012). Umożliwia ona zaprojektowanie związków wiążących się jedynie z PDE10A zmniejszając ryzyko niepożądanych oddziaływań z innymi białkami rodziny fosfodiesteraz.

PDE10A ulega wysoce specyficznej ekspresji w średnich neuronach kolczastych (Seeger *i in.*, 2003; Lakics *i in.*, 2010). Dzięki temu możliwe jest uzyskanie dwóch pożądanых cech charakteryzujących potencjalny cel interwencji farmakologicznej. Efekt inhibicji tzw. efekt *on-target*, jest ograniczony jedynie do jednej grupy komórek, w których białko pełni ściśle zdefiniowaną rolę. Równocześnie, brak znaczącej ekspresji w pozostałych tkankach ogranicza możliwość wystąpienia efektów niepożądanych, niezwiązanych z działaniem w prążkowiu.

W związku z profilem ekspresji tego enzymu postawiono tezę, że inhibicja PDE10A może stanowić nowe podejście terapeutyczne chorób związanych jądrami podstawnymi, w tym przede wszystkim w terapii schizofrenii. Badania nad funkcją PDE10A u myszy z wyłączonym genem *Pde10a*, wykazały, że zwierzęta te posiadają zmniejszoną aktywność lokomotoryczną i odpowiadają w mniejszym stopniu na traktowanie antagonistami NMDA powodującymi stany nadaktywności ruchowej. Te wyniki potwierdzały hipotezę, że PDE10A bierze udział w regulacji aktywności neuronów MSN i zahamowanie jej aktywności może skutkować efektami antypsychotycznymi zbliżonymi do antagonistów receptora D2 (Siuciak *i in.*, 2006).

Jak opisano powyżej, PDE10A posiada unikalne cechy dla potencjalnego celu interwencji farmakologicznej. Doprowadziło to do rozpoczęcia intensywnych poszukiwań inhibitorów PDE10A prowadzonych przez firmy farmaceutyczne i jednostki naukowe (Chappie *i in.*, 2012; Świerczek *i in.*, 2019). Pierwszym opisanym inhibitorem PDE10A była papaweryna, alkaloid naturalnie występujący w główkach makowych. Charakteryzowała się ona umiarkowaną aktywnością i selektywnością (Siuciak *i in.*, 2006). W krótkim czasie po opisaniu papaweryny wiele firm farmaceutycznych rozpoczęło programy badawcze mające na celu opracowanie wysoce aktywnych i selektywnych cząsteczek. Udało się w ten sposób rozwinąć inhibitory, które umożliwiły dalsze badania funkcji PDE10A. Do najintensywniej wykorzystywanych związków należały: PQ-10 (Chappie *i in.*, 2007), TP-10 (Schmidt *i in.*, 2008), MP-10 (Grauer *i in.*, 2009), THPP-1 (Smith, Uslaner, *i in.*, 2013), JNJ-42314415 (Megens *i in.*, 2014), PDM-042 (Arakawa *i in.*, 2016) oraz TAK-063 (Harada *i in.*, 2015). Żaden z projektów nie wykroczył jednak poza drugą fazę badań klinicznych (patrz 1.4.6). Należy jednak zwrócić uwagę na badanie opublikowane przez firmę Takeda w czasie trwania niniejszego projektu, w

którym wykazano, że różne inhibitory PDE10A posiadają różne właściwości kinetyczne przekładające się na szybkości dysocjacji tych cząsteczek od enzymu. Dowiedziono, że związki szybko oddysocjujące od enzymu posiadają mniejszą tendencję do aktywacji ścieżki bezpośredniej, co może przekładać na skuteczniejsze działanie antypsychotyczne (Suzuki i Kimura, 2018). Związkiem szybko oddysocjującym jest TAK-063, z czym wiąże się częściowo pozytywne wyniki uzyskane w badaniach klinicznych. Te wyniki uzasadniają dalsze poszukiwania cząsteczek hamujących aktywność PDE10A mimo braku doniesień o zakończonych sukcesem badaniach klinicznych.

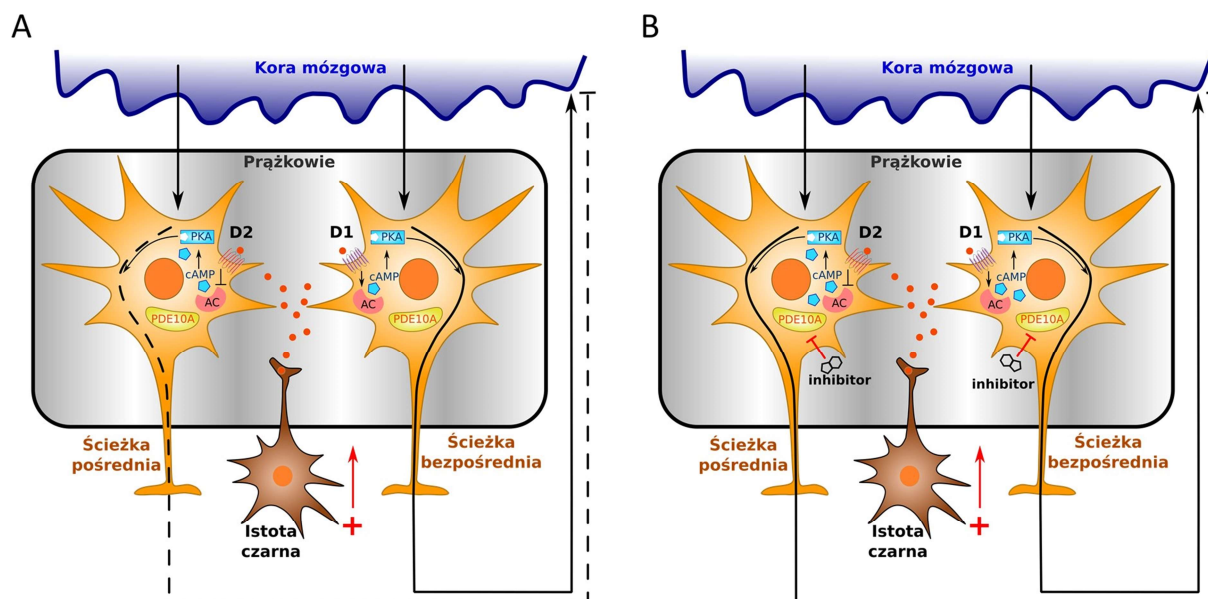
#### **1.4.4 Wpływ inhibitorów PDE10A na przekąźnictwo sygnałowe**

Wykazano, że zahamowanie aktywności PDE10A małocząsteczkowymi inhibitorami prowadzi do dawkozależnego wzrostu stężeń cyklicznych nukleotydów w prądkowiu zarówno u myszy jak i u szczurów *in vivo* (Chappie *i in.*, 2007; Schmidt *i in.*, 2008; Grauer *i in.*, 2009; Malamas *i in.*, 2012; Suzuki *i in.*, 2016). Wykazano również, że wzrost poziomu cyklicznych nukleotydów skutkuje wzrostem fosforylacji szeregu białek zależnych od PKA i PKG: GluR1, CREB, DARPP-32, H3, ERK, MSK1, przy czym najsilniejsze zmiany w obserwuje się dla GluR1, które mogą wynosić nawet 15-krotność sygnału podstawowego (Schmidt *i in.*, 2008; Suzuki *i in.*, 2015; Beaumont *i in.*, 2016). Wzrost cAMP w wyniku zahamowania aktywności PDE10A został również wykazany w badaniach *ex vivo* wykonanych na skrawkach mysiego mózgu, w których wykazano również dawkozależny wzrost fosforylacji białek zależnych od aktywności PKA (Nishi *i in.*, 2008; Polito *i in.*, 2015). Równocześnie, inhibicja PDE10A nie miała wpływu na fosforylację białek zależnych od cyklicznych nukleotydów w części presynaptycznej, do których należą hydroksylaza tyrozynowa czy synapsyna 1, potwierdzając, że PDE10A odgrywa kluczową rolę w części postsynaptycznej. Ponadto, w badaniach *ex vivo* nie zaobserwowano wzrostów stężenia cGMP po zastosowaniu inhibitorów PDE10A (Stipanovich *i in.*, 2008; Polito *i in.*, 2015). Jednym z możliwych wytłumaczeń tego efektu jest brak aktywacji nNOS w interneuronach prądkowia, która następuje poprzez wzrost aktywności w całej sieci połączeń nerwowych i jest niemożliwa do zarejestrowania w doświadczeniach wykorzystujących skrawki mózgu.

Inhibicja PDE10A skutkowała również indukcją IEG takich jak *c-Fos*, *Npas4*, *Egr-1* czy *Arc* (Gentzel *i in.*, 2015) oraz zwiększoną ekspresją markerów aktywności neuronalnej wliczając w to substancję P, enkafalinę, neurotensynę (Strick *i in.*, 2010; Suzuki *i in.*, 2015).

Ponadto badania profilu ekspresji genów metodą mikromacierzy wykazały, że inhibicja PDE10A skutkuje modulacją transkrypcji wielu innych genów. Uzyskane wyniki pokazały, że zahamowanie aktywności PDE10A skutkuje nie tylko krótkotrwałymi zmianami w przekaźnictwie sygnałowym, ale wpływa również na procesy długofalowe w średnich neuronach kolczastych (Kleiman *i in.*, 2011).

Jak opisano wcześniej (patrz 1.3.2), obie grupy średnich neuronów kolczastych tworzących ścieżkę pośrednią i bezpośrednią wykazują przeciwstawne działanie wzmacniając lub osłabiających sygnał płynący przez wzgórze do kory. W związku z powyższym, analizowano również efekty inhibitorów PDE10A niezależnie w obu ścieżkach. Antagoniści receptora D2 działają antypsychotycznie poprzez aktywację neuronów ścieżki pośredniej. Zastosowanie inhibitorów PDE10A wywołuje podobny efekt (Rycina 5). Analiza fosforylacji białka DARPP-32 u szczurów wykazała wzbogaconą frakcję ufosforylowanego białka w neuronach wykazujących ekspresję receptorów D2 sugerując większe pobudzenie neuronów ścieżki pośredniej po zahamowaniu aktywności PDE10A (Nishi *i in.*, 2008). Pomiar aktywacji PKA w skrawkach mysiego mózgu z zastosowaniem sensorów odpowiadających na aktywność PKA wykazał ponownie zwiększoną aktywność neuronów ścieżki pośredniej bez aktywności w ścieżce bezpośredniej, mimo porównywalnego wzrostu cAMP w obu grupach komórek (Polito *i in.*, 2015). Badania skupiające się na przekaźnictwie sygnałowym zależnym od cGMP również wykazały zwiększoną odpowiedź neuronów ścieżki pośredniej w odpowiedzi na stymulację elektryczną w trakcie badań elektrofizjologicznych (Threlfell *i in.*, 2009; Padovan-Neto *i in.*, 2015). Opisane wyżej badania wykonane na skrawkach tkanki mózgowej zostały również potwierdzone w badaniu *in vivo*, w którym wykazano zwiększoną fosforylację histonu H3 w neuronach ścieżki pośredniej. Co więcej, ta nierównowaga w aktywacji obu ścieżek była obserwowana jedynie w części grzbietowo-przyśrodkowej prążkowie, której dysfunkcja powiązana jest ze schizofrenią (Polito *i in.*, 2015). Obserwowany silniejszy efekt w ścieżce pośredniej ograniczony do części grzbietowo-przyśrodkowej prążkowie wspiera hipotezę o możliwym zastosowaniu inhibitorów PDE10A jako terapii schizofrenii.



Rycina 5 **Inhibicja PDE10A normuje aktywność neuronów w prążkowie w schizofrenii.** A) W schizofrenii w wyniku wysokiego stężenia dopaminy dochodzi do nadmiernej aktywacji ścieżki bezpośredniej i zahamowania aktywności ścieżki pośredniej, co skutkuje nadaktywnością prążkowie. B) Zastosowanie inhibitorów PDE10A i wzrost stężenia cyklicznych nukleotydów w średnich neuronach kolczastych prowadzi przede wszystkim do wzrostu aktywności ścieżki pośredniej, równoważąc działanie obu ścieżek prążkowie. Na podstawie Nishi *i in.*, 2011.

#### 1.4.5 Efekty behawioralne zahamowania aktywności PDE10A

Opisana zwiększona odpowiedź ścieżki pośredniej na modulację inhibitorami PDE10A znajduje swoje odbicie w efektach antypsychotycznych wykazanych w czasie badań behawioralnych w wielu modelach zwierzęcych psychozy. W modelach nadaktywności lokomotorycznej wywołanych blokadą receptorów NMDA przy pomocy fencyklidyny lub MK-801, jak i w modelach, w których zwiększone uwalnianie dopaminy związane jest podaniem amfetaminy czy też agonistów receptorów dopaminowych (np. apomorfiny), inhibitory PDE10A wykazują działanie zbliżone do antagonistów receptora D2, zmniejszając nasilenie efektów lokomotorycznych (Menniti *i in.*, 2021). W teście warunkowego unikania, który bez farmakologicznej indukcji objawów psychotycznych bada przypisanie istotności danemu bodźcowi, zarówno leki antypsychotyczne jak i inhibitory PDE10A w wyraźny sposób blokują odpowiedź warunkowego unikania (Schmidt *i in.*, 2008; Grauer *i in.*, 2009; Malamas *i in.*, 2011; Suzuki *i in.*, 2015). Inhibitory PDE10A wykazują dodatkowo działanie prokognitywne wykazane w testach rozpoznawania nowego obiektu czy też w teście przełączania uwagi (Grauer *i in.*, 2009; Nikiforuk *i in.*, 2016; Shiraishi *i in.*, 2016). W części testów behawioralnych inhibitory PDE10A wykazują jednak inny profil odpowiedzi niż jest to w przypadku leków antypsychotycznych, wskazując na odmienny mechanizm działania. Dotyczy to przede

wszystkim testu hamowania przedsygnatowego (Grauer *i in.*, 2009; Suzuki *i in.*, 2016) czy katalepsji, której nasilenie po podaniu inhibitorów PDE10A jest niskie i często nie wykazuje dawkozależności (Schmidt *i in.*, 2008; Grauer *i in.*, 2009; Megens *i in.*, 2014; Suzuki *i in.*, 2015). Obserwowane różnice względem leków antypsychotycznych wynikają przede wszystkim z ekspresji PDE10A zarówno w ścieżce pośredniej jak i bezpośredniej. Mimo opisanego powyżej silniejszego efektu podania inhibitorów PDE10A obserwowanego w ścieżce bezpośredniej, przy wyższych stężeniach związku dochodzi również do aktywacji neuronów w ścieżce pośredniej. W takim przypadku ścieżka pośrednia przeciwdziała efektem ścieżki bezpośredniej, co prowadzi między innymi do braku dawkozależności, obserwowanej m.in. w testach katalepsji (Menniti *i in.*, 2021).

Co również istotne z punktu widzenia bezpieczeństwa stosowania inhibitorów PDE10A, badane związki nie wykazały efektów niepożądanych charakterystycznych dla leków antypsychotycznych w badaniach na zwierzętach, jakimi są np. hiperprolaktynemia czy hiperglikemia (Grauer *i in.*, 2009; Suzuki *i in.*, 2015).

#### **1.4.6 Badania kliniczne inhibitorów PDE10A**

Dla części badanych inhibitorów PDE10A pozytywnie zakończono fazę badań przedklinicznych i rozpoczęto fazę badań klinicznych jako potencjalnej terapii schizofrenii wraz z objawami towarzyszącymi czy terapii choroby Huntingtona. Druga faza badań klinicznych została zakończona dla inhibitorów firmy Pfizer (MP-10/PF-02545920), Takeda (TAK-063), Merck (MK-8189) oraz Lundbeck (Lu AF11167) (Świerczek *i in.*, 2019). Związek MP-10 był poddany badaniom u pacjentów ze schizofrenią oraz chorobą Huntingtona i w żadnym z tych badań nie wykazał efektywności. Pozostałe wymienione powyżej związki były testowane tylko w schizofrenii. Badanie kliniczne dla TAK-063 nie spełniło pierwszorzędowych punktów końcowych, ale wykazało częściową efektywność antypsychotyczną w punktach drugorzędowych. Dla MK-8189, pomimo negatywnych wyników pierwszego z badań drugiej fazy, rozpoczęto kolejne badanie kliniczne, które jeszcze się nie zakończyło (nr badania [clinicaltrials.gov: NCT04624243](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT04624243)). Związek Lu AF11167 był analizowany pod kątem wpływu na objawy negatywne w schizofrenii, jednak nie wykazano skuteczności terapeutycznej tego inhibitora. Biorąc pod uwagę kwestię bezpieczeństwa, inhibitory PDE10A były dobrze tolerowane, co potwierdza wcześniejsze doniesienia z badań przedklinicznych (Tsai *i in.*, 2016). Obserwowano objawy senności, wskazujące na efekty psychoaktywne podanych związków,

a w wyższych dawkach występowały również dystonie w obrębie głowy, karku i języka, co może potwierdzać modulację przewodnictwa nerwowego w obrębie jąder podstawnych.

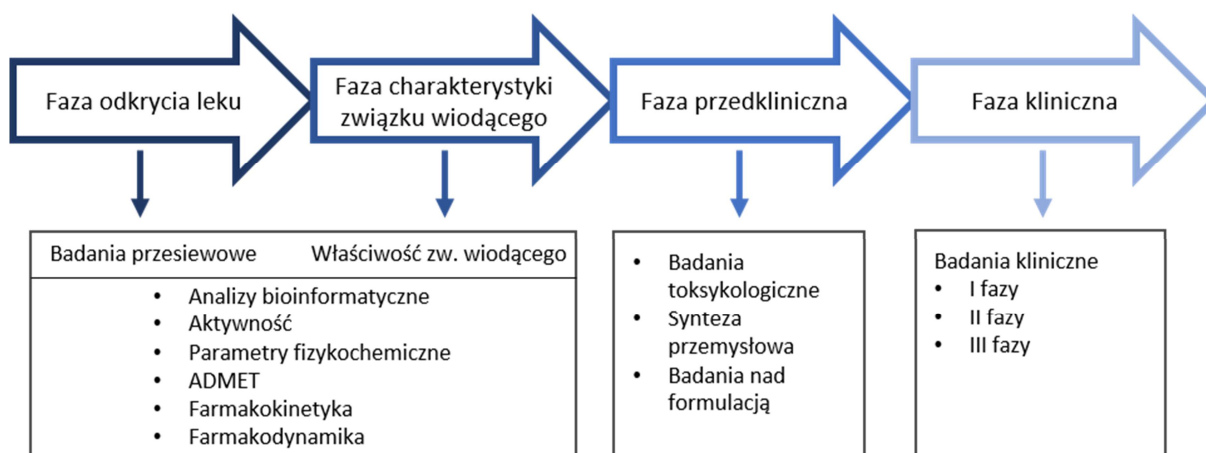
## 1.5 Proces rozwoju leku drobnocząsteczkowego

Proces rozwoju nowych leków jest interdyscyplinarnym i złożonym procesem wymagającym wysokich nakładów finansowych i czasowych. Szacuje się, że koszt rozwoju jednego leku wynosi około 1,3 miliarda dolarów amerykańskich, a czas potrzebny do jego opracowania i rejestracji to średnio 12-15 lat (DiMasi *i in.*, 2016). Wyzwaniem w rozwoju leku pozostaje minimalizacja ryzyka zakończenia projektu przedwcześnie w wyniku niekorzystnych właściwości takich jak toksyczność, brak efektywności czy niska biodostępność (Kola i Landis, 2004). Z tego względu możliwie szeroko zakrojone badania w początkowych fazach projektu grają kluczową rolę, przekładając się bezpośrednio na powodzenie badań klinicznych (Waring *i in.*, 2015). Badania wspomniane powyżej powinny obejmować analizę zróżnicowanych właściwości, do których należą aktywność, selektywność, stabilność, rozpuszczalność, biodostępność, bezpieczeństwo, patentowalność. Częsteczki, dla których uda się zbalansować powyższe aspekty, mają wysokie szanse rozpocząć badania kliniczne, które mogą doprowadzić do wprowadzenia kandydata na lek na rynek.

Proces rozwoju nowego leku można podzielić na fazę odkrycia leku, charakterystykę związku wiodącego, fazę przedkliniczną oraz fazę kliniczną (Rycina 6). Faza odkrycia leku rozpoczyna się po wyborze celu molekularnego, którego modulacja stanowi założenie skutecznej terapii danego schorzenia. Początkowy etap odkrycia leku ma na celu wyłonienie cząsteczek aktywnych (ang. *hits*). Selekcja związków odbywa się na podstawie badań przesiewowych, które uwzględniają aktywności względem celu molekularnego jak i parametry fizyko-chemiczne (tzw. deskryptory molekularne), charakteryzujące cząsteczki pod kątem właściwości lekopodobnych. Przykładem deskryptorów molekularnych są: masa molowa, lipofilowość, wartość powierzchniowej polaryzacji, współczynnik podziału logD oraz logP, liczba donorów wiązań wodorowych czy pKa. Badania aktywności wykonuje się przede wszystkim metodami *in vitro* i mogą obejmować takie testy jak biofizyczne oddziaływanie z białkiem, testy inhibicji enzymów czy wykorzystanie kultur komórkowych. Badania przesiewowe zostają często wsparte analizami *in silico*, wliczając w to analizy dokowania molekularnego czy analizy bioinformatyczne oparte na uzyskanych wynikach tzw. analizy zależności struktura-aktywność. Celem badań przesiewowych jest również możliwa

identyfikacja jak największej liczby aktywnych chemotypów, co minimalizuje ryzyko zakończenia badań, gdy jeden rodzaj struktur okaże się nierokujący. Częsteczki aktywne zostają kolejno scharakteryzowane pod względem właściwości, które mają na celu wybór cząsteczki wiodącej. Na tym etapie badania uwzględniają nie tylko weryfikację aktywności cząsteczki, ale ocenie może podlegać selektywność, parametry ADME (ang. *absorption, distribution, metabolism, excretion*; wchłanianie, dystrybucja, metabolizm, wydalanie), toksyczność, farmakokinetyka czy potwierdzenie mechanizmu działania zarówno w doświadczeniach *in vitro* jak i *in vivo*. Należy również podkreślić, że szczególną rolę w rozwoju kandydatów na leki psychiatryczne i neurologiczne odgrywa zdolność penetracji bariery krew-mózg, która ze względu na swoją budowę i funkcję różni się od innych barier biologicznych w organizmie, będąc trudniej przepuszczalną od pozostałych. Określenie zdolności związków do przenikania przez tę barierę jest niezbędne i może się odbyć tylko na drodze *in vivo*, jako że nie istnieje możliwość dokładnego określenia tych właściwości za pomocą metod bioinformatycznych czy doświadczeń *in vitro*. Na podstawie badań przesiewowych zostaje dokonany wybór cząsteczki wiodącej, dla której weryfikowane są uzyskane wyniki eksperymentów oraz wykonywane są rozszerzone badania. Mają one na celu dokładne zdefiniowanie mechanizmu działania, farmakodynamiki, właściwości cząsteczek jako przyszłych leków: fizyko-chemicznych, ADME czy wstępnej toksykologii.

Potwierdzenie tych właściwości pozwala na rozpoczęcie fazy przedklinicznej. Badanie w tej fazie skupiają się w głównej mierze na dostarczeniu wyników badań opisanych międzynarodowymi wytycznymi regulacyjnymi, które są niezbędne do rozpoczęcia badań klinicznych. Obejmują one badania toksykologiczne, badania nad wydajną syntezą cząsteczek, możliwością ich odpowiedniej formulacji oraz badania jakościowe substancji i produktów. Pomyślne zakończenie tej fazy skutkuje możliwością złożenia dokumentacji do właściwego organu nadzorującego rynek leków w celu rozpoczęcia badań klinicznych prowadzących do weryfikacji założeń u pacjentów i ostatecznie umożliwiając rejestrację cząsteczki jako leku.



Rycina 6 **Proces rozwoju leku drobnocząsteczkowego.** W procesie rozwoju leku można wyróżnić fazy odkrycia leku, charakterystyki związku wiodącego, przedkliniczną i kliniczną. Faza odkrycia leku w wyniku badań przesiewowych prowadzi do wyboru związku wiodącego. Metody wykorzystywane w dwóch pierwszych fazach, w zależności od celu molekularnego i postępów w projekcie znajdują zastosowanie w obrębie obu faz. Faza przedkliniczna obejmuje zaawansowane badania, często wykonywane w zgodzie z dobrą praktyką laboratoryjną, które prowadzone są dla kandydata mogącego rozpocząć badania kliniczne. Faza badań klinicznych jest ostateczną weryfikacją założeń dotyczących efektywności terapeutycznej i bezpieczeństwa.



## 2 CELE PRACY

Leczenie schizofrenii, pomimo dostępności leków antypsychotycznych pierwszej i drugiej generacji, stanowi wciąż znaczącą niezaspokojoną potrzebę medyczną. Ze względu na lekooporność, brak leków skutecznych względem symptomów poznawczych i negatywnych oraz liczne efekty uboczne dostępnych terapii, poszukiwane są nowe substancje antypsychotyczne, które oparte byłoby na nowym mechanizmie działania. Mimo że do tej pory zakończone badania kliniczne dla inhibitorów PDE10A nie wykazały ich przewagi nad aktualnie dostępnymi terapiami, to częściowo pozytywne wyniki uzyskane dla TAK-063 świadczą o potencjale tej grupy związków, a wykazany wpływ na domeny poznawcze na poziomie badań przedklinicznych uzasadnia dalsze poszukiwania skutecznych leków opartych na inhibicji PDE10A.

W związku z powyższym, głównym celem niniejszej pracy była selekcja innowacyjnego inhibitora PDE10A oraz scharakteryzowanie go pod kątem właściwości farmakologicznych.

Główny cel rozprawy był realizowany poprzez następujące cele szczegółowe:

- Badanie przesiewowe potencjalnych inhibitorów PDE10A pod kątem rozpuszczalności i aktywności względem PDE10A oraz określenie wstępnej selektywności cząsteczek.
- Identyfikacja związku wiodącego poprzez analizę wyników stabilności metabolicznej, badania farmakokinetycznego oraz wpływu na fosforylację białka GluR1 *in vivo*.
- Szczegółowa charakterystyka farmakokinetyczna związku wiodącego oraz określenie jego biodostępności.
- Zbadanie wpływu związku wiodącego na stężenie cyklicznych nukleotydów w prążkowie, hipokampie i korze mózgowej wraz z porównaniem do związków referencyjnych.
- Zbadanie wpływu związku wiodącego na wybrane geny wczesnej odpowiedzi w prążkowie, hipokampie i korze mózgowej wraz z porównaniem do związków referencyjnych.

### 3 MATERIAŁY I METODY

Tabela 1 Skład buforów i roztworów stosowanych w doświadczeniach

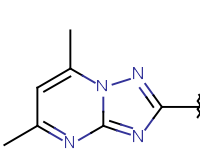
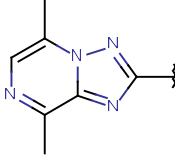
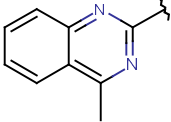
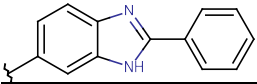
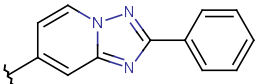
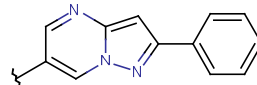
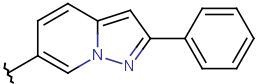
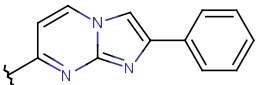
Roztwór/bufor	Skład
Roztwory używane w teście enzymatycznym PDE-Glo	
Bufor hamujący PDE10A	Termination buffer 5x (Promega)
	10 mM MP-10 (Seleckchem)
	woda
Bufor hamujący PDE1C	Termination buffer 5x (Promega)
	10 mM IBMX (SigmaAldrich)
	woda
Roztwór do detekcji sygnału	5x Detection Buffer (Promega)
	PKA (Promega)
	woda
Bufor do homogenizacji tkanek	
Bufor RIPA z inhibitorami proteaz i fosfataz	Bufor RIPA (Sigma)
	Mieszanina inhibitorów proteaz (1x Halt Protease Inhibitor Single-Use Cocktail, Thermo Fisher Scientific)
	Mieszanina inhibitorów fosfataz (1x PhosSTOP™, Roche)
	5 mM EDTA
Roztwory używane w metodzie SDS-PAGE i Western blot	
Sól fizjologiczna buforowa Tris (1x) (ang. <i>Tris– buffered saline</i> , TBS)	20 mM Tris-HCl
	500 mM NaCl
Bufor płuczący TBS-T	20 mM Tris-HCl
	500 mM NaCl
	0,1% Tween20
Bufor do elektroforezy	25 mM Tris base
	250 mM glicyna
	0,1% SDS
Bufor do transferu	25 mM Tris
	192 mM glicyna
	20% metanol
Bufor Laemmliego (2x), denaturujący	0,6 M Tris
	20% glicerol
	0,01% błękit bromofenolowy, pH = 6,8
	20% β-merkaptioetanol

### 3.1 Biblioteka związków drobnocząsteczkowych

Związki zostały zaprojektowane i zsyntetyzowane przez Dział Chemii Medycznej Celon Pharma S.A. W oparciu o dane dostępne w domenie publicznej obejmujące znane inhibitory PDE10A (Kehler i Kilburn, 2009; Chappie *i in.*, 2012; Kehler, 2013) oraz strukturę białka (Wang *i in.*, 2007), została zaprojektowana biblioteka związków. Związki zbudowane były z trzech członów i uwzględniały kluczowe miejsca oddziaływania z PDE10A: oddziaływanie z aminokwasem tyrozyną w pozycji 683 (PDB ID 3HQY) tworzącą wiązanie wodorowe z rdzeniem cząsteczki, oddziaływanie z przestrzenią hydrofobową oraz oddziaływanie z charakterystyczną dla tej fosfodiesterazy kieszenią selektywności (Moszczyński-Pętkowski *i in.*, 2018). Poprzez wzajemne połączenie kolejnych członów wyodrębniono 15 podstawowych połączeń (Tabela 2) będących podstawą do dalszych modyfikacji chemicznych. Wzajemne kombinacje fragmentów strukturalnych zostały opisane grupami od A do O. Nie było możliwe powstanie przedstawicieli pięciu zaproponowanych grup. W obrębie pozostałych grup do badań przesiewowych przekazano 23 związki. Pełne struktury wraz z parametrami zostały przedstawione w załączniku 1.

Związki referencyjne MP-10 (Seleckchem) oraz TAK-063 (Sun-shine Chem) zostały zakupione.

Tabela 2 **Biblioteka związków stanowiących potencjalne inhibitory PDE10A**. Biblioteka została zaprojektowana i zsyntetyzowana przez Dział Chemii Medycznej Celon Pharma S.A. Kolejne grupy chemotypów powstały z połączenia fragmentów strukturalnych tworząc 15 grup. Związki będące przedstawicielami grup G, H, I, L, O nie powstały z powodu przeszkód syntetycznych.

			
	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b>
	<b>G</b>	<b>H</b>	<b>I</b>
	<b>J</b>	<b>K</b>	<b>L</b>
	<b>M</b>	<b>N</b>	<b>O</b>

### 3.2 Rozpuszczalność

Związki były rozpuszczane w DMSO (SigmaAldrich) w stężeniu docelowym 10 mM. Następnie związki mieszano na mieszadle automatycznym przez 10 sekund i sprawdzano przez obserwację, czy związek się rozpuścił. W przypadku negatywnej odpowiedzi, zawiesina była podgrzewana do 90°C i ponownie sprawdzano, czy związek się rozpuścił.

### 3.3 Test enzymatyczny inhibicji fosfodiesteraz

#### 3.3.1 Fosfodiesterazy

W teście wykorzystano:

- rekombinowaną ludzką fosfodiesterazę 10A1, która została oczyszczona do homogenności z komórek Sf9 z nadekspresją genu kodującego PDE10A1 (numer GenBank: NM\_001130690; SigmaAldrich);
- rekombinowaną ludzką fosfodiesterazę 1C, która została oczyszczona do homogenności z komórek Sf9 z nadekspresją genu kodującego PDE1C (numer GenBank: NM\_005020; Signalchem).

#### 3.3.2 Procedura przeprowadzenia testu

Hamujące działanie związków chemicznych sprawdzano z zastosowaniem luminescencyjnej metody PDE-Glo (Promega Corporation) na płytkach 96-dołkowych. Test prowadzono dla 8 stężeń danego związku (w zakresie 17,5-1000 nM lub 8-280 nM).

Roztwory związków rozcieńczano szeregowo w buforze reakcyjnym (PDE-Glo Reaction Buffer) do uzyskania pożądanych stężeń. Do dołka płytki 96-dołkowej dodawano 5  $\mu$ l (reakcja z PDE10A) lub 4  $\mu$ l (reakcja z PDE1C) tak przygotowanych roztworów. W przypadku PDE10A, w następnej kolejności do dołka dodawano 7,5  $\mu$ l mieszaniny reakcyjnej, w skład której wchodził enzym PDE10A rozcieńczony w buforze reakcyjnym. Końcowa zawartości PDE10A w dołku wynosiła 3,5 ng. Dla reakcji z PDE1C, dodawano 8,5  $\mu$ l roztworu, w którego skład wchodził enzym PDE1C oraz roztwór  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmoduliny (SignalChem) rozcieńczony w buforze reakcyjnym. Końcowa zawartości PDE1C w dołku wynosiła 4,4 ng. Aby umożliwić interakcję badanych związków chemicznych z enzymem, płytki inkubowano przez 1 minutę w temperaturze pokojowej, a następnie przez 9 minut w temperaturze 4°C. Reakcję inicjowano poprzez dodanie do dołka 12,5  $\mu$ l 2  $\mu$ M (PDE10A) lub 1  $\mu$ M (PDE1C) roztworu cAMP (Promega). Następnie płytkę inkubowano w temperaturze 30°C. Po upływie 40 min dla PDE10A lub 30 min dla PDE1C reakcję zatrzymywano poprzez dodanie 12,5  $\mu$ l buforu hamującego z dodatkiem nadmiaru inhibitora fosfodiesterazy (Tabela 1). Zawartość płytki mieszano przez 10 minut za pomocą mieszadła orbitalnego, a następnie do dołka dodawano 12,5  $\mu$ l świeżo przygotowanego Roztworu do detekcji. Płytkę inkubowano przez 20 minut w temperaturze pokojowej, po czym do dołka dodawano 50  $\mu$ l odczynnika Kinase-Glo (Kinase-Glo Reagent; Promega) i kontynuowano inkubację płytki w temperaturze pokojowej przez

kolejne 10 minut. Po upływie czasu inkubacji intensywność luminescencji w dołku mierzono za pomocą luminometru Victor Light (Perkin Elmer).

Na podstawie porównania intensywności luminescencji w dołkach kontrolnych i w dołkach zawierających badane związki chemiczne wyznaczano procent inhibicji enzymu przez analizowane cząsteczki. Dla każdej płytki wyznaczano współczynnik Z' (Zhang, 1999). W przypadku wartości tego czynnika poniżej 0,5 wyniki testu nie były uwzględniane w analizach. Wyniki uzyskane dla wszystkich 8 stężeń każdego z badanych związków wykorzystywano do dopasowania krzywej regresji z zastosowaniem czteroparametrycznego modelu logistycznego w programie GraphPad Prism 5.03 (GraphPad Software). Na podstawie uzyskanych krzywych wyznaczano wartość stężenia związku, przy którym aktywność enzymu była hamowana w połowie (IC<sub>50</sub>, ang. *half-maximal inhibitory concentration*). Kontrolę pozytywną stanowiła mieszanina reakcyjna zawierająca wszystkie wymienione odczynniki za wyjątkiem badanych związków, zaś kontrolę negatywną stanowiła mieszanina reakcyjna zawierająca wszystkie wymienione odczynniki z wyłączeniem badanych związków i enzymu fosfodiesterazy.

### 3.4 Analiza Pareto

Określenie rankingu związków na podstawie algorytmu Pareto zostało wykonane przez Dział Chemii Medycznej. Algorytm maksymalizował wartość MPO (ang. *multiparameter optimization*) i minimalizował wartości IC<sub>50</sub> (Obayashi *i in.*, 2004). Wartość MPO została określona zgodnie z opisem zaprezentowanym przez Wager *i wsp.* (Wager *i in.*, 2010) i uwzględniała masę molową, lipofilowość, wartość powierzchniowej polaryzacji, współczynnik podziału logD, liczbę donorów wiązań wodorowych oraz pKa (Tabela Z1).

### 3.5 Test stabilności metabolicznej I fazy

Badanie stabilności metabolicznej zostało przeprowadzone przez firmę Selvita zgodnie z wewnętrznymi procedurami firmy. Kontrolę doświadczenia stanowiły dwa związki chemiczne o znanej szybkości metabolizmu: verapamil – szybko metabolizowany związek oraz donepezil – umiarkowanie metabolizowany związek. 75 µl mieszaniny mikrosomów szczurzych z kofaktorami (NADP, G6P, G6PDH, MgCl<sub>2</sub>) lub bez zostało rozpipetowane do dołków płytki 96-dołkowej. Roztwory związków rozcieńczano w buforze potasowo-fosforanowym (1 mM, pH 7,4) do uzyskania pożądaných stężeń. Kolejno dodawano 75 µl

roztworu roboczego substancji badanych w odpowiednim stężeniu. W kolejnym kroku do dołków z odczytem dla punktu czasowego 0 min dodawano 150 µl zimnego acetonitrylu. Płytkę inkubowano w termomikserze w 37°C i 400 rpm. Reakcja była zatrzymywana 20 min, 40 min i 60 min po rozpoczęciu reakcji poprzez dodanie 150 µl zimnego acetonitrylu. Po zakończeniu reakcji we wszystkich dołkach płytka została odwirowana (2000 x g, 15 min, 4°C). 200 µl supernatantu było poddawana analizie LC-MS.

Pomiary przeprowadzono z wykorzystaniem chromatografu cieczowego Ultimate 3000 RS (Dionex) i spektrometru masowego typu pułapka jonowa Bruker Daltonics Amazon SL (Bruker). Rozdział chromatograficzny był prowadzony na kolumnie Kinetex 2.6 u XB-C18 100A 50 x 3mm (Phenomenex), przez 5 min przy przepływie 1 ml/min. Skład fazy ruchomej to: bufor A (0,1 % kwas octowy) oraz bufor B (acetonitryl + 0,1% kwas mrówkowy). Monitorowano jony o stosunku masy do ładunku (m/z): 341,1 (CPL500007); 341,1 (CPL500012); 342,2 (CPL500013); 342,1 (CPL500020); 337,1 (CPL500024); 359,1 (CPL500029); 348,1 (CPL500032); 342,1 (CPL500036).

Procent zawartości związku chemicznego względem zawartości w punkcie t = 0 min był obliczany na podstawie poniższego wzoru:

$$\%_t \text{ związku względem } t_{0 \text{ min}} = \frac{\text{powierzchnia pików}_{t \text{ 0 min}}}{\text{powierzchnia pików}_t} \times 100\% \quad (1)$$

Czas półtrwania  $t_{1/2}$  był wyznaczany z poniższego wzoru:

$$T_{1/2} = \frac{0.693}{k} \quad (2)$$

gdzie: k – stała eliminacji związku równa ujemnej wartości nachylenia prostej zależności logarytmu naturalnego z procentowej zawartości związku jako funkcji czasu

Klirens wewnętrzny  $Cl_{int}$  był wyznaczany z poniższego wzoru:

$$Cl_{int} = \frac{V_d \times 0,693}{T_{1/2}} \quad (3)$$

$$\text{gdzie: } V_d = \frac{1}{\text{stężenie białka} \left( \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right)} \quad (4)$$

### 3.6 Przesiewowe badanie farmakokinetyczne i farmakodynamiczne

#### 3.6.1 Przebieg podania związków i izolowania tkanek

Podanie, uśmiercenie oraz pobranie tkanek została wykonana przez personel Centrum Medycyny Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Doświadczenie zostało przeprowadzone zgodnie z wytycznymi i za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej do spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Białymstoku (uchwała nr 69/2013 z dnia 18.12.2013). Do eksperymentu wykorzystano samce szczurów szczepu Wistar w wieku około 10 tygodni. Przed podaniem związków zwierzęta były głodzone 16h. Szczury w grupie kontrolnej otrzymały nośnik. Pozostałe grupy zwierząt otrzymały badane cząsteczki w dawce 10 mg/kg. Związki zostały podane w objętości 0,2 ml/100 g masy ciała dożołądkowo (po, łac. *per os*) za pomocą sztywnej sondy. Rozpuszczalnik (nośnik) stanowił wodny roztwór 0,5% metylocelulozy i 2% Tween. Krew oraz mózg były pobierane w punktach 15 min, 30 min, 1h, 2h oraz 4h po podaniu związków. Bezpośrednio przed pobraniem krwi zwierzęta były wprowadzane w stan narkozy (2-3% wziewny izofluran). W każdym z podanych punktów czasowych krew była pobierana z serca w objętości 2,6 ml. Krew została pobrana do probówek zawierających K<sub>3</sub>EDTA i odwirowana (2000 g, 15 min, w temperaturze pokojowej) w celu separacji osocza, które zostało przeniesione do probówek schłodzonych uprzednio w suchym lodzie. Osocze było przechowywane w temperaturze -80°C do czasu analizy. Po całkowitym skrwawieniu z serca wypreparowywano mózg. Jedną półkulę mrożono natychmiast w -80°C celem przekazania do badań farmakodynamicznych, a drugą, po dwukrotnym przepłukaniu solą fizjologiczną i dodaniu wody w objętości 3 ml na każdy gram tkanki, homogenizowano, mrożono w -80°C i przekazywano do badań farmakokinetycznych.

#### 3.6.2 Pomiar stężeń związków w badaniu przesiewowym

Pomiar stężenia analitów zostało zlecone Laboratorium Bioanalityczne firmy Blirt S.A. Osocze oraz homogenaty mózgu były rozcieńczane w metanolu do uzyskania odpowiednich stężeń (5 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 500 ng/ml, 1000 ng/ml, 2500 ng/ml) i kolejno mieszane z roztworem acetonitrylu w stosunku 1:10 z dodatkiem wzorca wewnętrznego (drotaweryna dla CPL500012, CPL500032 i MP-10 lub CPL500032 dla CPL500020 i CPL500036) w celu ekstrakcji analitów do próbek. Po odwirowaniu (4000 g, 6 min, 5°C) nadsącz był rozcieńczany w fazie ruchomej (0,1% roztwór kwasu mrówkowego) celem rozpoczęcia analizy.



Pomiary dla CPL500012, CPL500032 i MP-10 przeprowadzono z wykorzystaniem chromatografu cieczowego (Thermo Finnigan) i spektrometru masowego typu potrójny kwadrupol (Thermo Scientific). Rozdział chromatograficzny był prowadzony na kolumnie Hypersil BDS, 1x50 mm, 5  $\mu$ m (Thermo Scientific) w temperaturze 25°C przez 4,5 min przy przepływie 0,2 ml/min. Objętość nastrzyku wynosiła 2  $\mu$ l, a skład fazy ruchomej to: bufor A (0,1% kwas mrówkowy) oraz bufor B (acetonitryl + 0,1% kwas mrówkowy). Monitorowane przejścia jonowe dla związków to: 341,1 -> 80,29; 341,1 -> 194,05 (CPL500012), 348,06 -> 80,29; 348,06 -> 107,19 (CPL500032), 395,12 -> 115,22; 395,12 -> 143,06 (MP-10), 398,20 -> 326,09; 398,20 -> 354,14 (drotaweryna). W celu uzyskania jonizacji związku wykorzystano źródło ESI (jonizacja elektrosprejem), napięcie na kapilarze wynosiło 3500V, a temperatura gazu 150°C.

Pomiary dla CPL500020 i CPL500036 przeprowadzono z wykorzystaniem chromatografu cieczowego Ultimate 3000 RS (Dionex) i spektrometru masowego typu kwadrupol i analizator czasu przelotu micrOTOF-Q II (Bruker). Rozdział chromatograficzny był prowadzony na kolumnie Kinetex 1.7u C18 100A, 2.1x50 mm (Phenomenex), w temperaturze 40°C przez 6 min przy przepływie 0,3 ml/min. Objętość nastrzyku wynosiła 5  $\mu$ l, a skład fazy ruchomej to: bufor A (0,1 % kwas octowy) oraz bufor B (acetonitryl). Monitorowano jony o stosunku masy do ładunku (m/z): 342,14 (CPL500020); 342,14 (CPL500036); 348,11 (CPL500032). W celu uzyskania jonizacji związku wykorzystano źródło ESI (jonizacja elektrosprejem), napięcie na kapilarze wynosiło 4500V, a temperatura gazu 200°C.

Stężenie związków w próbach określono na podstawie przygotowanej krzywej kalibracyjnej, uzyskane wartości zostały znormalizowane w odniesieniu do zastosowanego standardu wewnętrznego.

### **3.6.3 Analiza fosforylacji GluR1 metodą Western blot**

#### **3.6.3.1 Przygotowanie lizatów**

Zamrożona półkula mózgu była rozmrażana na lodzie, a następnie preparowano prążkowie i je ważono. Dla tkanek zwierząt uzyskanych po podaniu nośnika oraz związków MP-10, CPL500012 i CPL500032 w kolejnym kroku dodawano buforu RIPA z inhibitorami proteaz i fosfataz w objętości 10  $\mu$ l na 1 mg tkanki i homogenizowano przy użyciu homogenizatora ręcznego przez 1 min, na lodzie. Następnie homogenaty odwirowano (8000 g, 10 min) w temperaturze 4 °C w celu oczyszczenia próbek z pozostałości fragmentów tkanek.

W następnym kroku w tak otrzymanych lizatach dokonywano pomiaru stężenia białka metodą wykorzystującą kwas bicinchionowy (BCA) z użyciem zestawu BCA Protein Assay Kit (Pierce). Kolejno do lizatów dodawano 2 razy stężony bufor Laemmliego i po denaturowaniu w 95°C przez 5 minut przechowywano w temperaturze -80°C. Do tkanek uzyskanych po podaniu nośnika oraz CPL500036 był dodawany kwas trichlorooctowy (TCA) w objętości 10-krotności masy prądkowia. Następnie prądkowie homogenizowano kolejno przy użyciu homogenizatora ręcznego przez 1 min, na lodzie oraz przy użyciu homogenizatora ultradźwiękowego przez 5 min. W kolejnym kroku homogenaty odwirowano (150 g, 10 min) w temperaturze 4°C. Osad był płukany 3-krotnie eterem (SigmaAldrich) i próbka była każdorazowo krótko odwirowywana (10000 g, 30 s, 4°C). Pozostały eter odparowywano w 40°C przez 5 min. Kolejno dodawano 500 µl zimnego acetonu (SigmaAldrich) zawierającego 20 mM ditiotretitol (DTT) i próbkę mieszano przez 1 min. Po odwirowaniu (15000 g, 10 min) w temperaturze 4 °C nadsącz był usuwany a pozostały aceton odparowywany przez 10 min w temperaturze pokojowej. Osad był rozpuszczany w roztworze Laemmliego zawierającego β-merkaptotetanol w objętości 1 µl na 1 mg tkanki przez noc w 4°C. Kolejno próbki denaturowano w 95°C przez 5 minut i przechowywano w temperaturze -80°C.

### 3.6.3.2 Oznaczenie stężenia białek

Stężenie białka w lizacie białkowym w buforze RIPA z inhibitorami proteaz i fosfataz oznaczano kolorymetrycznie przy użyciu zestawu BCA Protein Assay Kit (Pierce) na podstawie krzywej standardowej sporządzone w oparciu o znane stężenia roztworu albuminy bydlęcej (ang. *bovine serum albumin*, BSA). W pierwszej kolejności przygotowano serię rozcieńczeń dla krzywej standardowej roztworu BSA w buforze RIPA. Krzywa była przygotowywana dla 7 stężeń w zakresie 25-2000 mg/ml. Następnie, przygotowywano roztwór roboczy BCA mieszając ze sobą odczynnik A i B w stosunku 1:50, który nakładano na dołki płytki 96-dołkowej w objętości 200 µl. Następnie do odpowiednich dołków dodawano 10 µl roztworów standardów oraz badanych lizatów białkowych. Płytkę umieszczono następnie w wyrząsarce orbitalnej i reakcję inkubowano przez 30 min w 37°C po czym zmierzono absorbancję przy długości fali 562 nm z użyciem czytnika płytkowego (Multiscan™, ThermoFisher Scientific).

### 3.6.3.3 Elektroforeza białek w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)

Elektroforezę białek w żelu denaturującym (ang. *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, SDS-PAGE) prowadzono zgodnie z procedurą opisaną przez Laemmliego (Laemmli, 1970), używając systemu Mini-Protean TetraCell (Bio-Rad). Elektroforeza była prowadzona w żelu dwuwarstwowym, nieciągotym o grubości 1,5 mm. Żel zagęszczający o długości około 2 cm zawierał 5% roztworu akryloamidu/bis-akryloamidu (29:1) i 0,125 M Tris-HCl (pH 6,8), natomiast żel rozdzielający zawierał 10% roztwór akryloamidu/bis-akryloamidu (29:1) i 0,375 M Tris-HCl (pH 8,8). Oba żele zawierały dodatek 0,1% SDS. Na żel nakładano 20 µg białka z lizatu białkowego uzyskanego po przygotowaniu za pomocą buforu RIPA lub 2 µl lizatu białkowego przygotowanego ekstrakcją TCA. Jako standardu mas cząsteczkowych białek użyto Precision Plus Protein Kaleidoscope Prestained Protein Standard (10-250 kDa Biorad).

### 3.6.3.4 Western blotting

Po zakończeniu elektroforezy białka przenoszono z żelu na membranę nitrocelulozową metodą elektrotransferu (100V, 60 min) w aparacie Mini-Protean TetraCell (Bio-Rad) w buforze do transferu. Następnie, membrany przepłukiwano w TBS-T i blokowano wolne miejsca na membranie mogące niespecyficznie wiązać białka w roztworze 5 % odtłuszczonego mleka w proszku w TBS-T, przynajmniej przez dwie godziny w temperaturze pokojowej. Membrany inkubowano przez noc w temperaturze 4°C z odpowiednim przeciwciałem pierwszorzędowym w roztworze 5 % odtłuszczonego mleka w proszku w TBS-T (Tabela 3). W kolejnym dniu membranę płukano w roztworze TBS-T, a następnie inkubowano z przeciwciałem drugorzędowym sprzężonym z HRP w roztworze 5% odtłuszczonego mleka w proszku w TBS-T przez dwie godziny w temperaturze pokojowej (Tabela 3). Po tym czasie membrany przepłukano w TBS-T. Analizowane białka wizualizowano metodą chemiluminescencji a sygnał rejestrowano na kliszach fotograficznych. Odczyt densytometryczny wykonano za pomocą programu GeneSnap (Syngene). Każde doświadczenie Western blot zostało powtórzone przynajmniej dwukrotnie ze zmianą kolejności próbek w czasie elektroforezy. Uzyskany sygnał dla form ufosforylowanych białka oraz dla białka całkowitego był normalizowany względem  $\beta$ -tubuliny, a następnie wyznaczano stopień fosforylacji poprzez obliczenie stosunku sygnału białka ufosforylowanego do białka

całkowitego. Normalizacja pomiędzy kolejnymi powtórzeniami była wykonywana poprzez odniesienie sygnałów do próbki normalizacyjnej (próbka badana we wszystkich wybranych powtórzeniach).

Tabela 3 Lista przeciwciał stosowanych w metodzie Western blot.

Antygen	Rodzaj	Pochodzenie	Rozcieńczenie	Producent i nr katalogowy
Fosfo-Ser845-GluR1	Pierwszorzędowe	Monoklonalne królicze	1:3000	Millipore Sigma 04-1073
GluR1	Pierwszorzędowe	Poliklonalne królicze	1:2000	Millipore Sigma AB1504
$\beta$ -tubulina	Pierwszorzędowe	Monoklonalne mysie	1:30000	Millipore Sigma 05-661
Anty-królicze IgG sprzężone z HRP	Drugorzędowe	Monoklonalne kozie	1:4000	Cell Signaling Technology, 7074
Anty-mysie IgG sprzężone z HRP	Drugorzędowe	Poliklonalne końskie	1:30000	Cell Signaling Technology, 7076

### 3.7 Rozszerzone badania farmakokinetyczne

#### 3.7.1 Model zwierzęcy, podanie CPL500036 i pobranie materiału do analiz

Podanie, uśmiercenie oraz pobranie tkanek zostało wykonane w przez personel Trójmiejskiej Akademickiej Zwierzętarńi Doświadczalnej Centrum Badawczo-Usługowego (TAZD – CBU) Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Doświadczenie zostało przeprowadzone zgodnie z wytycznymi i za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej do spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Bydgoszcy (uchwała nr 3/2015 z dnia 23.03.2015).

Do doświadczenia wykorzystano samce z hodowli niekrewniaczej szczurów szczepu Wistar Han w wieku około 10 tygodni pochodzących z hodowli TAZD – CBU Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Szczury utrzymywano w standardowych klatkach hodowlanych, z wolnym dostępem do wody i pożywienia, w 12-godzinnym rytmie światło/ciemność. Zwierzęta były głodzone przez 12 godzin przed podaniem związku. CPL500036 był podawany w wodnym roztworze 0,5% metylocelulozy i 2% Tween 80.

CPL500036 w dawce 0,3 mg/kg został podany 5 szczurom dożylnie (iv, ang. *intravenous*) w objętości 0,2 ml na 100g masy ciała. Następnie pobierano krew w objętości ok. 200  $\mu$ l/pobranie w siedmiu punktach czasowych: 10 min, 30 min, 1h, 2h, 4h, 7h oraz 12h licząc od momentu podania związku.

W celu zbadania penetracji bariery krew-mózg 40 osobników otrzymało dożyłkowo CPL500036 w dawce 3 mg/kg w objętości 0,5 ml na 100 g masy ciała. W ośmiu punktów czasowych: 15 min, 30 min, 1h, 2h, 4h, 7h, 12h i 24h – licząc od momentu podania preparatu – skrwawiano całkowicie z serca po pięć szczurów na każdy punkt czasowy, a następnie pobierano od nich mózgi. Pobrane mózgi ważono, płukano dwukrotnie dużą ilością soli fizjologicznej i homogenizowano w jałowej, schłodzonej wodzie (w proporcji 3 ml wody na 1 g mózgu). Homogenaty mrożono w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$ .

W celu zbadania dawkozależności, 20 osobników otrzymało dożyłkowo CPL500036 w dawkach 0,75 mg/kg, 1,5 mg/kg, 3 mg/kg i 6 mg/kg w objętości 0,5 ml na 100 g masy ciała. Następnie pobierano krew w objętości ok. 150  $\mu\text{l}$  na pobranie w siedmiu punktach czasowych: 15 min, 30 min, 1h, 2h, 4h, 7h, 12h oraz 24h licząc od momentu podania związku. Krew pobierano do próbek z  $\text{K}_3\text{EDTA}$ . Pobrane próbki zwirowano (2000 g, 15 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Uzyskane osocze przechowywano w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 3.7.2 Pomiar stężeń związków

Pomiar stężenia analitów zostało wykonane przez Laboratorium Bioanaliz firmy Celon Pharma S.A. Do 50  $\mu\text{l}$  próbki osocza lub homogenatu mózgu dodawano 150  $\mu\text{l}$  roztworu ekstrakcyjnego składającego się z acetonitrylu i wzorca wewnętrznego (donepezil). W kolejnym kroku próbki wytrząsano przez 2 min, a następnie wirowano przez 4 min przy 4000 g, wszystkie etapy prowadzono w temperaturze pokojowej. Nadsącz przenoszono (ok. 150  $\mu\text{l}$ ) do fiolek autosamplera. Pomiar przeprowadzono z wykorzystaniem chromatografu cieczowego (Infinity 1260, Agilent) i spektrometru masowego typu potrójny kwadrupol (6460 Agilent). Rozdział chromatograficzny był prowadzony na kolumnie Zorbax SB 50x2,1; 1,8 $\mu\text{m}$  (Agilent) w temperaturze  $30^{\circ}\text{C}$  przez 7,5 min przy przepływie 0,4 ml/min. Objętość nastrzyku wynosiła 5  $\mu\text{l}$ , a skład fazy ruchomej to: bufor A (20 mM mrówczan amonu pH=3,0) oraz bufor B (acetonitryl z 0,1% kwasem mrówkowym). Akwizycja danych na spektrometrze masowym prowadzona była przez 5,5 min dla dwóch związków w trybie MRM (Multiple Reaction Monitoring), monitorowane przejścia jonowe dla związków to: 342,0  $\rightarrow$  220,9; 342  $\rightarrow$  235,9 (CPL500036) oraz 380,5  $\rightarrow$  362,9; 380,5  $\rightarrow$  243,5 (Donepezil). W celu uzyskania jonizacji związku wykorzystano źródło ESI (jonizacja elektrosprejem), napięcie na kapilarze wynosiło 5500V, a temperatura gazu  $320^{\circ}\text{C}$ . Stężenie związku (CPL500036) w próbach określono na podstawie

przygotowanej krzywej kalibracyjnej, uzyskane wartości zostały znormalizowane w odniesieniu do zastosowanego standardu wewnętrznego.

### 3.7.3 Analiza parametrów farmakokinetycznych

Stężenia związków w osoczu i mózgu zostały obliczone wg następujących procedur i wzorów:

$C_{max}$  - osiągnięte stężenie maksymalne – średnie stężenie maksymalne uzyskane w danym punkcie czasowym.

$t_{max}$  - czas osiągnięcia stężenia maksymalnego – odpowiada punktowi czasowemu, dla którego osiągnięto stężenie maksymalne.

$AUC_{(0,25-4h)}$  – pole powierzchni pod krzywą w czasie 15 min do 4h po podaniu związku.

$AUC_{(0-t)}$  – pole powierzchni pod krzywą w czasie 0 min do ostatniego punktu pomiarowego.

$AUC_{(0-inf)}$  – pole powierzchni pod krzywą w czasie 0 min do nieskończoności.

$AUC$  dla podań przyżyciowych jest średnią wartości  $AUC$  dla kolejnych osobników i zostało obliczone metodą trapezów (Grabowski, 2010).  $AUC$  dla pozostałych podań zostało obliczone metodą opisaną przez Bailera (Bailer i Ruberg, 1996).

$C_p0$  – stężenie początkowe wyznaczono z poniższego wzoru:

$$C_p0 = e^b \quad (5)$$

gdzie:  $b$  – punkt przecięcia prostej funkcji logarytmu stężenia od czasu logarytmu z osią  $y$

$k_{el}$  – stałą eliminacji wyznaczono z poniższego wzoru:

$$k_{el} = -a \quad (6)$$

gdzie:  $a$  – nachylenie prostej funkcji logarytmu stężenia od czasu.

$t_{1/2}$  – czas połowicznej eliminacji wyznaczono z poniższego wzoru:

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_{el}} \quad (7)$$

$V_D$  – objętość dystrybucji wyznaczono z poniższego wzoru:

$$V_D = \frac{A}{C_p0} \quad (8)$$

gdzie:  $A$  – podana masa związku.

$Cl_{tot}$  – klirens całkowity wyznaczono z poniższego wzoru:

$$Cl_{tot} = \frac{A}{AUC} \quad (9)$$

F – biodostępność wyznaczono z poniższego wzoru:

$$F = \frac{AUC_{po} * D_{iv}}{AUC_{iv} * D_{po}} \quad (10)$$

gdzie: AUC – AUC po podaniu dożyłkowym (po) lub dożylnym (iv)

D - dawka po podaniu doustnym (po) lub dożylnym (iv)

B/P – stosunek stężenia w mózgu do stężenia we krwi wyznaczono z poniższego wzoru:

$$B/P_{AUC} = \frac{AUC_{mózg}}{AUC_{osocze}} \quad (11)$$

$$B/P_{C_{max}} = \frac{C_{max} (mózg)}{C_{max} (osocze)} \quad (12)$$

Proporcjonalność wzrostu ekspozycji ( $AUC_{(0-inf)}$ ) oraz stężenia maksymalnego ( $C_{max}$ ) została przeanalizowana metodą zaprezentowaną przez Smith *i in.* (2000).

### 3.8 Badanie farmakodynamiczne

#### 3.8.1 Model zwierzęcy, podanie związków i pobranie materiału do analiz

Podanie, uśmiercenie oraz pobranie tkanek zostało wykonane przez personel Zakładu Farmakologii Doświadczalnej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk (PAN). Doświadczenie zostało przeprowadzone zgodnie z wytycznymi i za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej do spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie (uchwała nr 10/2015 z dnia 20.02.2015).

Do doświadczenia wykorzystano samce szczurów szczepu Sprague-Dawley w wieku około 10 tygodni pochodzących z hodowli Zwierzętarni Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN. Szczury utrzymywano w standardowych klatkach hodowlanych, z wolnym dostępem do wody i pożywienia, w 12-godzinnym rytmie światło/ciemność. CPL500036 był podawany w wodnym roztworze 0,5% metylocelulozy i 2% Tween 80, TAK-063 w roztworze 0,5% metylocelulozy w wodzie, MP-10 w zakwaszonym wodnym roztworze 0,5% metylocelulozy i 2% Tween 80, SKF82958 w soli fizjologicznej z dwiema kroplami Tween 80, haloperidol w roztworze 0,5% metylocelulozy w soli fizjologicznej. CPL500036, TAK-063 i MP-10 były podawane dożyłkowo, SKF82958 i haloperidol dootrzewnowo. Zwierzęta w wybranych punktach czasowych były uśmiercane skupioną wiązką mikrofal w urządzeniu Microwave Fixation System (Muromachi). Kolejno

preparowano mózgi i izolowano prążkowie, korę mózgową i hipokamp, które przechowywano w  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **3.8.2 Stężenie cyklicznych nukleotydów**

#### **3.8.2.1 Izolowanie frakcji zawierającej cykliczne nukleotydy**

Izolowanie frakcji zawierającej cykliczne nukleotydy prowadzono wg protokołu Cyclic AMP ELISA Kit (Cayman). Do tkanek dodawano 5% roztwór wodny kwasu trichloroocetowego (TCA) (Sigma) w objętości 5 ml/g tkanki. Po ręcznej homogenizacji i zwirowaniu 1500 g, 10 min, w temperaturze pokojowej, ekstrahowano TCA za pomocą nasyconego roztworu wodnego eteru. Po dodaniu eteru próbkę mieszano i następnie usuwano górną fazę roztworu. Po trzykrotnym płukaniu resztki eteru usuwano poprzez odparowanie w  $70^{\circ}\text{C}$  przez 7 min. Próbkę przechowywano w  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### **3.8.2.2 Pomiar stężenia cyklicznych nukleotydów**

Stężenie cAMP i cGMP mierzono testem immunoenzymatycznym (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) za pomocą zestawu Cyclic AMP ELISA Kit lub Cyclic GMP ELISA Kit (Cayman). Przed pomiarem próbki rozcieńczano pięcokrotnie w buforze reakcyjnym. Pomiar był wykonywany zgodnie z instrukcją producenta.

### **3.8.3 Badanie ekspresji genów**

#### **3.8.3.1 Izolowanie RNA**

Izolowanie RNA była wykonywana przy pomocy zestawu Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen) wg zaleceń producenta. Tkanek odpowiednich struktur była homogenizowana ręcznie w 100  $\mu\text{l}$  odczynnika Qiazol, a następnie rozcieńczana przez dodanie 900  $\mu\text{l}$  odczynnika Qiazol. Elucję RNA prowadzono w 30  $\mu\text{l}$  wody, a eluat przechowywano w  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### **3.8.3.2 Ocena jakościowa i ilościowa RNA**

RNA było oceniane jakościowo i ilościowo za pomocą zestawu RNA 6000 Nano Kit (Agilent) z wykorzystaniem aparatu Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent) zgodnie z instrukcją producenta. Po zakończonej elektroforezie próbki oceniano pod względem degradacji przy pomocy parametru integralności RNA (ang. *RNA integrity numer*, RIN) i stężenia RNA w próbce. Wszystkie próbki przekraczały minimalny akceptowalny próg parametru RIN wynoszący 5.



### 3.8.3.3 Synteza cDNA

Synteza cDNA była prowadzona przy pomocy zestawu Prime Script RT Master Mix (Perfect Real Time, Takara). Reakcja była prowadzona w 10 µl końcowej objętości mieszaniny reakcyjnej, a matrycę stanowiło 500 ng RNA (Tabela 4). Reakcja była prowadzona w 37°C przez 15 min, a następnie przerywano ją poprzez inaktywację odwrotnej transkryptazy przez inkubację w 85°C przez 5s. cDNA przechowywano w temperaturze -20°C.

Tabela 4 Skład mieszaniny reakcyjnej dla reakcji odwrotnej transkrypcji

Składnik	Ilość/objętość (1 reakcja)
RNA	500 ng
H <sub>2</sub> O	do końcowej objętości 8 µl
Prime Script RT Master Mix 2x (Perfect Real Time)	2 µl

### 3.8.3.4 Wybór genów referencyjnych dla badań ekspresji genów

Wybór genów referencyjnych został dokonany przy pomocy zestawu geNorm Reference Gene Selection Kit (Primerdesign). W reakcji wykorzystano cDNA powstałe na matrycy RNA wyizolowanego z tkanek zwierząt, które otrzymały CPL500036, haloperidol, SKF82958 lub nośnik i zostały uśmiercone po 4h od podania związków skupioną wiązką mikrofal (patrz 3.8.1). Reakcję prowadzono wg instrukcji producenta w objętości 15 µl za pomocą GoTaq® Green MasterMix (Promega). Do detekcji produktów reakcji używano fluorochromu SYBR Green. Skład mieszaniny zaprezentowano w Tabeli 5.

Tabela 5 Skład mieszaniny reakcyjnej dla reakcji qRT-PCR mającej na celu wybór genów referencyjnych

Składnik	Objętość (1 reakcja)
cDNA rozcieńczone 10x	1 µl
Startery Primerdesign 2x	1 µl
Master Mix (GoTaq® Green MasterMix, Promega)	10 µl
H <sub>2</sub> O	2,5 µl
ROX/CRX (Promega)	0,5 µl

Reakcja była prowadzona w urządzeniu StepOnePlus (Applied Biosystems) wg następującego programu:

Tabela 6 Program reakcji wyboru genów referencyjnych

Temperatura	Czas	Komentarze
95°C	10 s	1x
95°C	10 s	40x
60°C	60 s	
95°C	10 s	Krzywa topnienia
60°C	60 s	
95°C	10 s	

Rakcja została przeprowadzona dla genów: *Mdh1*, *B2m*, *Rpl1*, *Ubc*, *Gapdh*, *Cyc1*, *Ywhaz*, *Actb*, *Atp5b*, *Canx*, *Top1*, *18s* (sekwencje starterów w zestawie geNorm są nieujawnione).

Analizę wyboru genów referencyjnym przeprowadzono w programie qbase+ (Biogazelle). Stabilność ekspresji była oceniana przy pomocy parametru średniej stabilności geNorm M - wartość tego parametru poniżej lub równa 0,2 wskazuje na bardzo wysoką stabilność ekspresji danego genu – oraz parametru geNorm V – wartość geNorm V poniżej 0,15 dla danego porównania wariacji liczby genów referencyjnych oznacza brak potrzeby stosowania dodatkowych genów referencyjnych w reakcji qRT-PCR.

### 3.8.3.5 Analiza ekspresji genów wczesnej odpowiedzi metodą ilościowej łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (qRT-PCR)

Analiza ekspresji genów była prowadzona metodą wykorzystującą sondy TaqMan (ThermoFischer) (Tabela 7) oraz bufor reakcyjny TaqMan Fast Advanced Master Mix (2x) (ThermoFischer). Objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 10 µl (Tabela 8)

Tabela 7 Lista sond TaqMan

Symbol genu	Gatunek	Długość produktu (bp)	barwnik	Nr katalogowy sondy
<i>c-Fos</i>	Szczur	58	FAM-MGB	Rn02396759_m1
<i>Arc</i>	Szczur	119	FAM-MGB	Rn00571208_g1
<i>Npas4</i>	Szczur	78	FAM-MGB	Rn01454622_g1
<i>Egr-1</i>	Szczur	64	FAM-MGB	Rn00561138_m1
<i>Mdh1</i>	Szczur	74	FAM-MGB	Rn00583661_m1
<i>B2m</i>	Szczur	58	FAM-MGB	Rn00560865_m1

Tabela 8 Skład mieszaniny reakcyjnej dla reakcji qRT-PCR

Składnik	Objętość (1 reakcja)
cDNA rozcieńczone 100x	2 $\mu$ l
Sonda TaqMan	0,5 $\mu$ l
Master Mix (GoTaq® Green MasterMix, Promega)	5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	2,5 $\mu$ l
Objętość reakcji	10 $\mu$ l

Reakcja była prowadzona w urządzeniu StepOnePlus (Applied Biosystems) na płytkach 96-dołkowych wg następującego programu:

Tabela 9 Program reakcji qRT-PCR

Temperatura	Czas	Komentarze
95°C	20 s	1x
95°C	1 s	40x
60°C	20 s	
4°C	$\infty$	1x

### 3.9 Analiza statystyczna

Analizę statystyczną danych przeprowadzono przy użyciu programu GraphPad Prism 7. Wyniki na wykresach zostały przedstawione jako średnia  $\pm$  odchylenie standardowe (SD) lub jako średnia  $\pm$  zakres w badaniach farmakokinetycznych. Do oceny istotności statystycznej różnic pomiędzy wariantami doświadczalnymi zastosowano odpowiednie testy statystyczne. Normalność rozkładu testowano za pomocą testu Shapiro-Wilka. Do oceny istotności statystycznej różnic pomiędzy więcej niż dwiema grupami o rozkładzie odbiegającym od normalnego, stosowano test Kruskala-Wallisa z post-testem Dunna. Dla grup o rozkładzie normalnym, przy porównywaniu dwóch zmiennych niezależnych, do analiz używano dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z testem porównań wielokrotnych Bonferroniego lub Dunnetta. Dla wszystkich testów statystycznych zastosowano następujące oznaczenia poziomów istotności: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$ .

## 4 WYNIKI

### 4.1 Badania przesiewowe w poszukiwaniu drobnocząsteczkowego związku wiodącego hamującego aktywność PDE10A

#### 4.1.1 Badanie rozpuszczalności

Badania przesiewowe w poszukiwaniu inhibitorów PDE10A zostały rozpoczęte od analizy rozpuszczalności związków w dimetylosulfotlenku (DMSO) w stężeniu 10 mM. Z 23 związków rozpuszczalne w tym stężeniu były 21 związki (Tabela 10).

#### 4.1.2 Badanie inhibicji PDE10A oraz PDE1C

W celu określenia zdolności cząsteczek do inhibicji PDE10A, zostało wyznaczone  $IC_{50}$  w teście enzymatycznym z wykorzystaniem rekombinowanego enzym. Do dalszych testów zostały zakwalifikowane wszystkie związki, których wartość  $IC_{50}$  była równa lub niższa 1  $\mu$ M (Tabela 10).

W celu oceny wstępnej selektywności, 19 związków chemicznych zostało przebadanych pod względem aktywności wobec PDE1C - przedstawiciela rodziny fosfodiesteraz wybranego na podstawie zbliżonej budowy strukturalnej do PDE10A. Wszystkie przebadane struktury wykazały brak hamowania aktywności PDE1C do stężenia 10  $\mu$ M (Tabela 10).

Tabela 10. **Badanie przesiewowe rozpuszczalności, aktywności i selektywności.** Biblioteka związków, wraz z przypisaną grupą chemotypu, dla których określono rozpuszczalność w 10 mM DMSO oraz wyznaczono wartości  $IC_{50}$  względem enzymów PDE10A oraz PDE1C. Doświadczenia nie były kontynuowane dla CPL500035 i CPL500039 ze względu na brak rozpuszczalności. CPL50008 i CPL500017 ze względu na brak aktywności względem PDE10A nie był uwzględniony w badaniu selektywności. Zw. ref. – związek referencyjny

Nazwa związku	Grupa	Rozpuszczalny	$IC_{50}$ PDE10A [ $\mu$ M]	$IC_{50}$ PDE1C [ $\mu$ M]
CPL500007	A	Tak	0,08	>10
CPL500008	A	Tak	>1	-
CPL500010	A	Tak	0,79	>10
CPL500012	B	Tak	0,05	>10
CPL500013	A	Tak	0,20	>10
CPL500014	A	Tak	0,84	>10
CPL500015	D	Tak	0,38	>10
CPL500017	D	Tak	>1	-
CPL500020	M	Tak	0,10	>10
CPL500021	J	Tak	0,77	>10
CPL500024	C	Tak	0,32	>10
CPL500026	E	Tak	0,27	>10
CPL500027	B	Tak	0,04	>10
CPL500028	B	Tak	0,17	>10
CPL500029	B	Tak	0,06	>10
CPL500030	B	Tak	0,05	>10
CPL500032	B	Tak	0,08	>10
CPL500034	A	Tak	0,41	>10
CPL500035	B	Nie	-	-
CPL500036	N	Tak	0,04	>10
CPL500037	K	Tak	0,58	>10
CPL500039	B	Nie	-	-
CPL500040	F	Tak	0,88	>10
MP-10	Zw. ref.	Tak	0,09	-

#### 4.1.3 Wybór związków do badań *in vivo* na podstawie analizy *in silico*

Ze względu na skuteczne hamowanie aktywności enzymu (19 cząsteczek wykazało powinowactwo do PDE10A poniżej 1  $\mu\text{M}$ ) i selektywność związków -, selekcja najbardziej obiecujących struktur została wsparta obliczeniami *in silico* przeprowadzonymi przez Dział Chemii Medycznej Celon Pharma S.A.

Związek chemiczny, który może stać się lekiem, musi się charakteryzować nie tylko wysokim powinowactwem do wybranego celu terapeutycznego czy też selektywnością swojego działania, ale również posiadać odpowiednie właściwości fizyko-chemiczne, które przekładają się na zachowanie związku w organizmie np. na farmakokinetykę. Te właściwości mogą zostać obliczone na podstawie struktury danego związku. W związku z tym aktywne związki zostały opisane za pomocą deskryptorów molekularnych, które posłużyły do obliczenia wartości wieloparametrowej optymalizacji (MPO, ang. *multiparameter optimization*) (Wager *i in.*, 2010). Wartości MPO zostały skorelowane z wartościami  $\text{IC}_{50}$  i stosując analizę Pareto maksymalizującą wartości MPO i minimalizującą wartości  $\text{IC}_{50}$  (Obayashi *i in.*, 2004), związki zostały przypisane do kolejnych rang 1-6 (ranga 1 odpowiada najbardziej pożądanym właściwościom). Analiza Pareto została wykonana przez Dział Chemii Medycznej Celon Pharma S.A. a wyniki tej analizy zostały poddane opracowaniu w obrębie niniejszej pracy.

W obrębie grupy chemotypu A do analizy wybrano związek CPL500007 oraz CPL500013. Oba związki posiadały ranking 4 w analizie Pareto. W grupie A związek CPL500014 posiadał wyższy ranking - 3, jednak ze względu na wysoką wartość  $\text{IC}_{50}$ , 0,84  $\mu\text{M}$  wobec 0,08  $\mu\text{M}$  dla CPL500007 i 0,20  $\mu\text{M}$  dla CPL500013, uznano tę pochodną jako nierokującą. Z grupy chemotypu B zostało wybranych 3 przedstawicieli: CPL500029 i CPL500032 o randze 2 w analizie Pareto oraz CPL500012 o randze 3. Związek CPL500030, mimo rangi 2, ze względu na identyczny podstawnik w strukturze jak związek CPL500007 nie został zakwalifikowany do dalszych badań. Natomiast związek CPL500012 posiadał niższą wartość  $\text{IC}_{50}$  niż CPL500028. Związki CPL500020, CPL500024 oraz CPL500036 zostały wybrane jako jedyni przedstawiciele swoich klastrów. Przedstawiciele grup D, E, F i J, K zostali określani jako nierokujący ze względu na problemy występujące w czasie syntezy. Ponadto związki z tych grup charakteryzowały się również niskim rankingiem w analizie Pareto, będąc maksymalnie zakwalifikowane w randze 5. Łącznie do dalszych doświadczeń wybrano osiem struktur będących przedstawicielami 5 grup chemotypów (Tabela 11).

Tabela 11 Wybór cząsteczek o największym potencjalne rozwoju na podstawie rankingu Pareto maksymalizującego wartości MPO i minimalizującego wartości IC<sub>50</sub>. Kolorem szarym zostały zaznaczone związki wybrane do dalszych analiz.

Nazwa związku	Grupa	Ranga Pareto
CPL500007	A	4
CPL500010	A	7
CPL500013	A	4
CPL500014	A	3
CPL500034	A	5
CPL500012	B	3
CPL500027	B	4
CPL500028	B	3
CPL500029	B	2
CPL500030	B	2
CPL500032	B	2
CPL500024	C	6
CPL500015	D	6
CPL500026	E	5
CPL500040	F	8
CPL500021	J	7
CPL500037	K	6
CPL500020	M	3
CPL500036	N	1

#### 4.1.4 Badania stabilności metabolicznej

Kolejnym kryterium wykorzystanym do dalszej selekcji molekuł jako potencjalnych kandydatów na lek, było określenie ich stabilności metabolicznej. Stabilność metaboliczna jest wstępnym doświadczeniem oceniającym, czy dana cząsteczka może ulegać rozkładowi przez enzymy wątrobowe i przez to ulegać szybkiej eliminacji w organizmie. Badanie stabilności metabolicznej w mikrosomach szczurzych I fazy zostało zlecone w firmie Selvita S.A.

Najbardziej stabilnym związkiem z najwyższą wartością klirensu wewnętrznego był związek CPL500020 (grupa chemotypu M), będąc stabilniejszym niż zastosowana w doświadczeniu kontrola – donepezil. Drugim i czwartym najbardziej stabilnym związkiem były związki z grupy chemotypu B: CPL500032 oraz CPL500012. Porównywalną stabilność do ostatniej molekuly miał przedstawiciel grupy N – CPL500036 – trzeci najbardziej stabilny związek. Przedstawiciele grupy chemotypu A CPL500007 oraz CPL500013 okazały się być mniej stabilne niż najbardziej stabilne związki z grup B, M i N. Związek referencyjny MP-10

wykazywał się stabilnością zbliżoną do związku CPL500012 (Tabela 12). Cztery najbardziej stabilne związki reprezentujące trzy chemotypy zostały wybrane do badań *in vivo*.

Tabela 12 **Ocena stabilności metabolicznej wybranych związków poprzez reakcję z mikrosomami szczurzymi.**  $Cl_{int}$  – klirens wewnętrzny,  $T_{1/2}$  – czas półtrwania. Związki zostały uszeregowane od najstabilniejszego do najmniej stabilnego metabolicznie.

Związek	Grupa	$T_{1/2}$	$Cl_{int}$
		min	$\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$
CPL500020	M	188,51	12,25
CPL500032	B	110,58	20,89
CPL500036	N	66,25	34,87
CPL500012	B	62,78	36,79
CPL500013	A	45,44	50,84
CPL500007	A	33,95	68,05
CPL500029	B	31,58	73,14
CPL500024	C	5,41	427,00
MP-10	Związek referencyjny	60,94	37,90
Verapamil	Kontrola - związek niestabilny	8,76	263,62
Donepezil	Kontrola - związek stabilny	110,45	20,92

#### 4.1.5 Selekcja związku wiodącego na podstawie badań *in vivo*

##### 4.1.5.1 Analiza profilu farmakokinetycznego w osoczu i w mózgu szczura po podaniu dożołądkowym

Określenie właściwości farmakokinetycznych związku innowacyjnego jest niezbędne do opisu jego zachowania w organizmie jak i potwierdzenia odpowiedniej ekspozycji w miejscu docelowym. Wykonanie przesiewowych badań farmakokinetycznych pozwala na wykluczenie związków, które nie spełniają kryterium biodostępności po podaniu dożołądkowym.

Badanie farmakokinetyczne dla czterech najbardziej stabilnych związków (CPL500012, CPL500020, CPL500032, CPL500036) oraz dla związku referencyjnego MP-10 zostało przeprowadzone na samcach szczurów szczepu Wistar Han, które otrzymały wybrane substancje dożołądkowo w stężeniu 10 mg/kg. Osocze oraz mózg do badań farmakokinetycznych zostały pobrane w punktach 15 min, 30 min, 1h, 2h oraz 4h po podaniu związku. Analiza farmakokinetyczną wykonano metodą HPLC – MS/MS. Podanie, uśmiercenie oraz pobranie tkanek zostało zlecone Centrum Medycyny Doświadczalnej Uniwersytetu



Medycznego w Białymstoku, a analiza stężeń związków została zlecona Laboratorium Bioanalitycznemu firmy Blirt S.A.

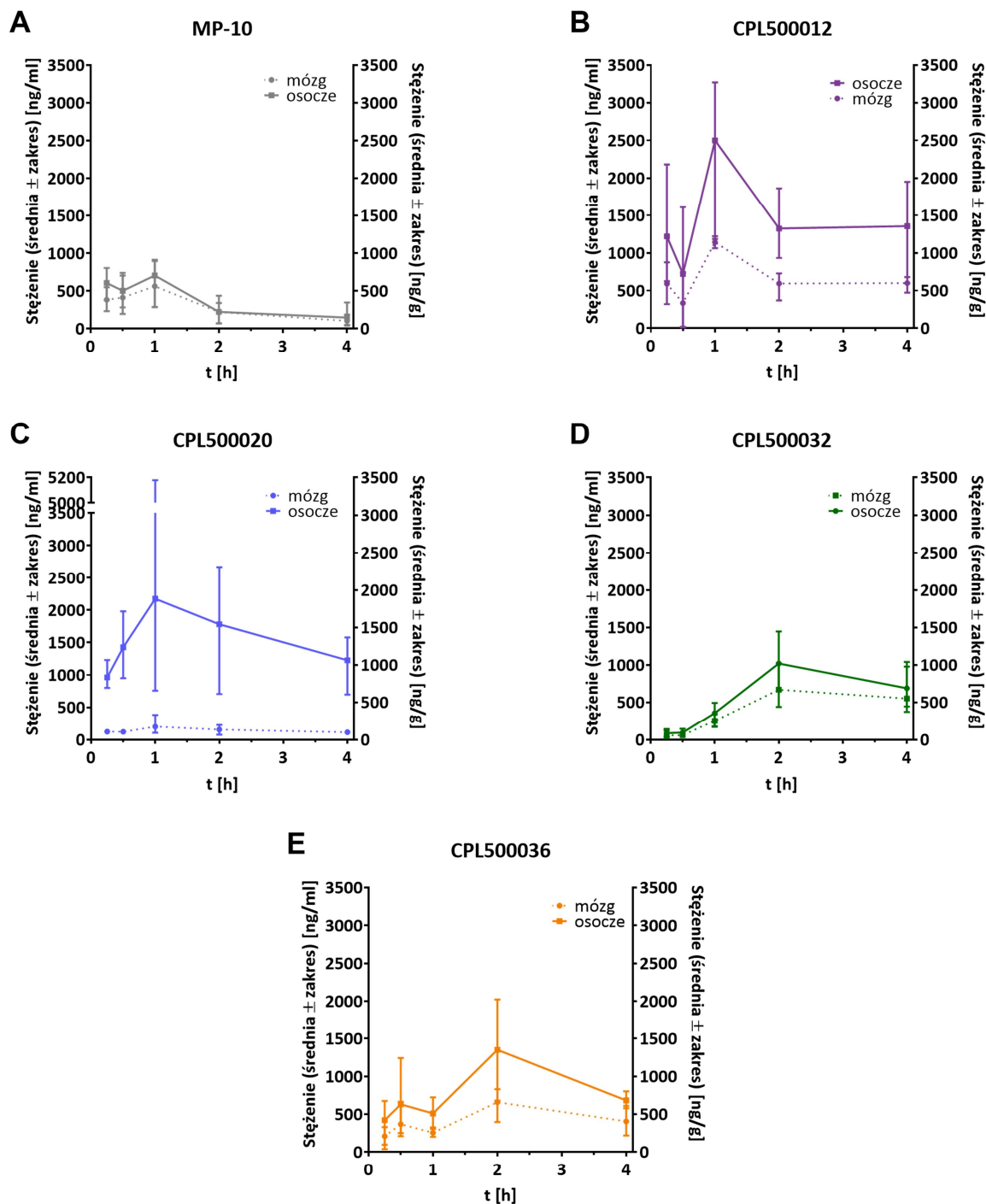
Związki były analizowane pod względem następujących parametrów farmakokinetycznych: maksymalnego stężenia ( $C_{max}$ ) analitu (danego związku) w osoczu oraz w mózgu, czasu od momentu podaniu związku, w którym osiągnane jest  $C_{max}$  i  $t_{max}$ , pola powierzchni pod krzywą w czasie 0,25-4h ( $AUC_{0,25-4h}$ ) oraz stosunku stężeń w mózgu i osoczu w czasie  $t_{max}$  (B/P). Parametry farmakokinetyczne zostały zaprezentowane w Tabeli 13 a przebieg krzywych farmakokinetycznych na Rycinie 7.

Związek referencyjny MP-10 osiągnął ekspozycję wyrażoną jako  $AUC_{0,25-4h}$  o wartości 1275 ng\*h/ml oraz maksymalne stężenie w osoczu ( $C_{max}$ ) o wartości 705 ng/ml. Wszystkie badane związki osiągnęły wyższe wartości stężenia maksymalnego w osoczu oraz ekspozycji niż związek referencyjny. Najwyższe wyniki ekspozycji uzyskano dla związku CPL500020 ( $AUC_{0,25-4h}$  = 6183 ng\*h/ml;  $C_{max}$  = 2175 ng/ml). W dalszej kolejności najwyższą ekspozycję uzyskał związek CPL500012 ( $C_{max}$  = 2500 ng/ml;  $AUC_{0,25-4h}$  = 5637 ng\*h/ml), CPL500036 ( $AUC_{0,25-4h}$  = 3382 ng\*h/ml;  $C_{max}$  = 1381 ng/ml) oraz CPL500032 ( $AUC_{0,25-4h}$  = 2529 ng\*h/ml;  $C_{max}$  = 1351 ng/ml). Wyniki uzyskane w wyniku pomiaru stężenia w mózgu przebiegają jednak w innej kolejności. Związek referencyjny MP-10 uzyskał wartość ekspozycji w tkance mózgowej równą 1057 ng\*h/ml ze stężeniem maksymalnym wynoszącym 1142 ng/ml. CPL500020 uzyskał najniższe stężenie maksymalne (198 ng/ml) i najniższą ekspozycję w mózgu (549 ng\*h/ml), dwukrotnie niższą niż dla związku referencyjnego MP-10. Najwyższe wartości stężenia maksymalnego w tkance mózgowej uzyskał związek CPL500012 ( $AUC_{0,25-4h}$  = 2545 ng\*h/ml;  $C_{max}$  = 1142 ng/ml). Pozostałe związki innowacyjne CPL500032 ( $AUC_{0,25-4h}$  = 1769 ng\*h/ml;  $C_{max}$  = 669 ng/ml) oraz CPL500036 ( $AUC$  = 1750 ng\*h/ml;  $C_{max}$  = 659 ng/ml) prezentowały podobny profil farmakokinetyczny. Wszystkie związki charakteryzowały się wartościami  $t_{max}$  w zakresie 1-2h. Czas osiągania wartości maksymalnych stężeń pomiędzy osoczem i mózgiem nie różnił się dla danych związków. Porównanie wartości stężeń pomiędzy osoczem a mózgiem w postaci parametru B/P pozwala na ocenę zdolności danego związku do penetrowania bariery krew-mózg. Najwyższym stosunkiem stężenia w mózgu do stężenia w osoczu w punktach  $C_{max}$  charakteryzował się związek referencyjny MP-10 (B/P = 0,8). Związki CPL500012, CPL500032 i CPL500036 charakteryzowały się podobnym stosunkiem B/P, który znajdował się w zakresie 0,46-0,6. Jedynie wartość B/P dla CPL500020 była niekorzystna i wynosiła 0,09.

Uzyskane wyniki wskazują na dobrą ekspozycję badanych związków po podaniu dożołądkowym zarówno w osoczu jak i w mózgu, z wyłączeniem CPL500020, który mimo wysokich stężeń uzyskanych w osoczu, charakteryzował się niskimi stężeniami w tkance mózgu.

Tabela 13 **Wybrane parametry farmakokinetyczne związków MP-10, CPL500012, CPL500020, CPL500032 oraz CPL500036** po dożołądkowym podaniu w dawce 10 mg/kg.  $C_{max}$  – osiągnięte stężenie maksymalne,  $t_{max}$  - czas osiągnięcia stężenia maksymalnego,  $AUC_{(15min-t)}$  – pole powierzchni pod krzywą w czasie wykonanych pomiarów, B/P ( $C_{max}$ ) – stosunek stężenia w mózgu do stężenia w osoczu dla stężeń maksymalnych

Dawka	10 mg/kg					
Droga podania	po					
Parametr	Jednostka	MP-10	CPL500012	CPL500020	CPL500032	CPL500036
$C_{max}$ (osocze)	ng/ml	705	2500	2175	1119	1351
$t_{max}$ (osocze)	h	1	1	1	2	2
$AUC_{0,25-4h}$ (osocze)	ng*h/ml	1275	5637	6183	2529	3382
$C_{max}$ (mózg)	ng/g	562	1142	198	669	659
$t_{max}$ (mózg)	h	1	1	1	2	2
AUC (mózg)	ng*h/ml	1057	2545	549	1769	1750
B/P ( $C_{max}$ )	-	0,80	0,46	0,09	0,60	0,49



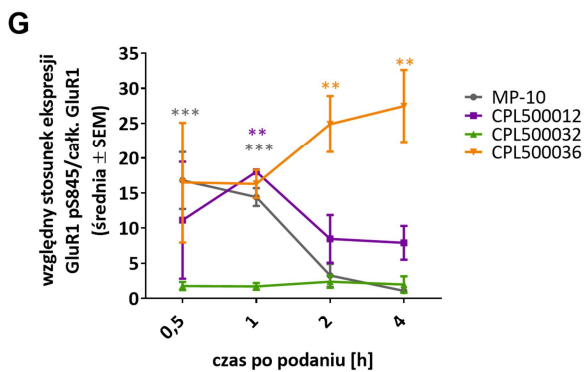
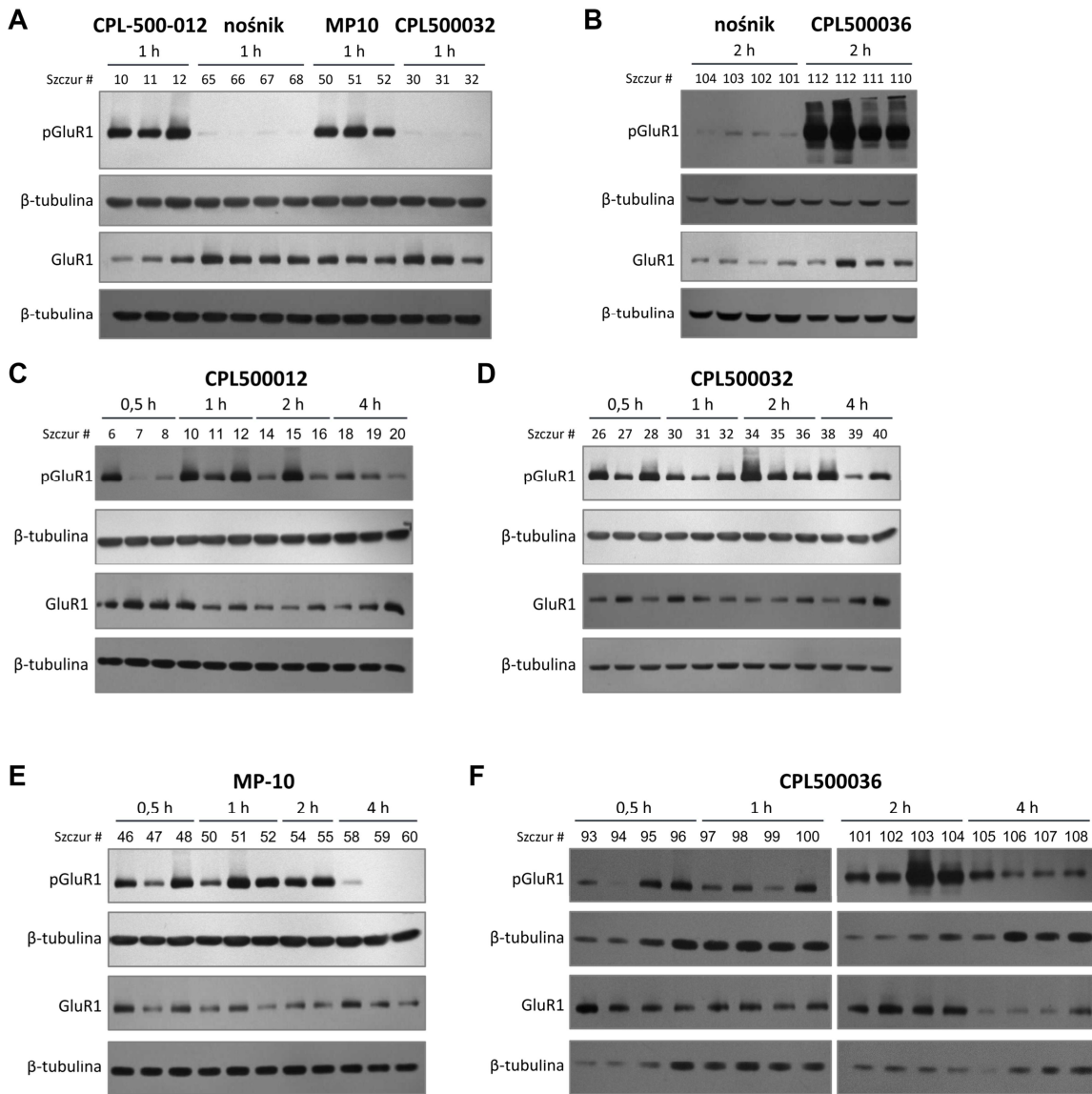
Rycina 7 **Profile farmakokinetyczne związków w badaniu przesiewowym.** Profile farmakokinetyczne związków MP-10 (A), CPL500012 (B), CPL500020 (C), CPL500032 (D) oraz CPL500036 (E) w osoczu oraz w mózgu szczurów, które otrzymały dożołądkowo badane związki w dawce 10 mg/kg ( $n = 4$ /punkt czasowy). Wykres przedstawia zależność stężenia związku w osoczu i mózgu od czasu. Lewa oś rzędnych przedstawia stężenie związku w osoczu w jednostkach ng/ml. Prawa oś rzędnych przedstawia stężenie związku w mózgu w jednostkach ng/g tkanki. Słupki błędów przedstawiają zakres stężeń. Linia ciągła prezentuje przebieg stężenia w osoczu, linia przerywana w mózgu.

#### 4.1.5.2 Analiza fosforylacji GluR1 jako markera modulacji ścieżki zależnej od stężenia cyklicznych nukleotydów

Równolegle do badania farmakokinetycznego wykonano badanie farmakodynamiczne w mózgu. W tym celu przeprowadzono analizę wpływu inhibitorów PDE10A na stopień ufosforylowania podjednostki receptora glutaminianu typu AMPA – GluR1 w lizacie białkowym pochodzącym z prądkowia z badania farmakokinetycznego opisanego w 4.1.5.1. Analiza fosforylacji białka GluR1 została przeprowadzona w strukturach prądkowia dla związków, dla których uzyskano zadawalającą penetrację bariery krew-mózg: CPL500012, CPL500032 i CPL500036. Kontrolę stanowiły lizaty białkowe z prądkowia wyizolowane ze zwierząt po podaniu związku referencyjnego MP-10 oraz po podaniu nośnika. Analiza fosforylacji białka GluR została wykonana techniką Western blot w lizatach białkowych z prądkowia pobranego w punktach czasowych 0,5h, 1h, 2h i 4h po podaniu związku (Rycina 8).

Podanie szczurom dożołądkowo związku referencyjnego MP-10 spowodowało zwiększoną fosforylację białka GluR1 w prądkowiu w porównaniu do nośnika. Fosforylacja była najsilniejsza w pierwszych mierzonych punktach czasowych, będąc 17-krotnie silniejszą niż w próbkach po podaniu nośnika i zaniknęła po 4h od podania związku. Podanie związku CPL500012 zwiększyło pulę ufosforylowanego białka GluR1 we wszystkich mierzonych punktach czasowych, również w 4h po podaniu, osiągając 18-krotny wzrost dla  $t = 1h$ . CPL500036 również wyraźnie zwiększył pulę ufosforylowanego białka CPL500036 osiągając najwyższe wartości, powyżej 20-krotnego wzrostu, dla czasów 2h i 4h po podaniu związku. Profil fosforylacji białka GluR1 różnił się natomiast dla związku CPL500032, którego podanie nie spowodowało znaczących zmian w puli fosforylacji podjednostki receptora AMPA, nie przekraczając dwukrotności odpowiadającej kontroli po podaniu nośnika.

Rycina 8 **Analiza fosforylacji GluR1 jako markera odpowiedzi na inhibicję PDE10A przez MP-10, CPL500012, CPL500032 lub CPL500036.** Lizaty szczurzego prądkowia poddano analizie fosforylacji białka GluR1 metodą Western blot. A-F prezentują reprezentatywne obrazy wykonanych analiz. Każde doświadczenie Western blot zostało powtórzone przynajmniej dwukrotnie ze zmianą kolejności próbek w czasie elektroforezy A) Porównanie związków MP-10, CPL500012 i CPL500032 względem nośnika (1h od podania związku). B) Porównanie związku CPL500036 względem lizatów białkowych uzyskanych po podaniu nośnika (2h od podania związku). C-F) Przebieg fosforylacji GluR1 dla MP-10, CPL500012, CPL500032 i CPL500036 w punktach czasowych 0,5, 1, 2 i 4h po podaniu związków. G) Analiza fosforylacji GluR1 w zależności od czasu. Krzywe prezentują wynik normalizacji odczytu densytometrycznego dla białka ufosforylowanego do puli białka całkowitego po poprzedniej normalizacji do białka kontrolnego –  $\beta$ -tubuliny. Zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji z testem post-hoc Bonferonni'ego \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  (na następnej stronie)



#### 4.1.5.3 Wybór związku wiodącego na podstawie badań behawioralnych

W wyniku przeprowadzonych doświadczeń wykazano, że dwa związki CPL500012 oraz CPL500036 charakteryzują się wysoką aktywnością hamującą wobec PDE10A, wysoką biodostępnością i penetracją bariery krew-mózg u szczurów oraz uzyskały pożądany efekt farmakodynamiczny mierzony stopniem ufosforylowania podjednostki receptora AMPA. Jednak żaden z wymienionych związków nie wykazał wystarczającej przewagi do uznania go za związek wiodący. Celem zróżnicowania obu związków wykorzystano wyniki badania behawioralnego - testu hiperlokomocji indukowanej fencyklidyny. Badanie zostało wykonane przez personel Zakładu Nowych Leków w Instytucie Farmakologii PAN pod kierownictwem prof. Piotra Popika. Fencyklidyna jest niekompetetywnym antagonistą receptora NMDA. W zgodzie z hipotezą glutaminianową jej podanie skutkuje objawami zbliżonymi do objawów w schizofrenii w tym psychozą czy zaburzeniami czynności poznawczych (Lodge i Mercier, 2015). Podanie fencyklidyny zwierzętom indukuje znaczny wzrost aktywności lokomotorycznej, która odwracana jest przez zastosowanie leków antypsychotycznych (Forrest *i in.*, 2014).

Doświadczenie hiperlokomocji indukowanej fencyklidyną zostało wykonane na szczurach, w czasie którego CPL500012 oraz CPL500036 zostały podane dożołądkowo. Badanie wykazało, że związek CPL500036 już w dawce 0,1 mg/kg odwraca działanie fencyklidyny, natomiast CPL500012 uzyskuje ten efekt dopiero w dawce 1 mg/kg.

Przeprowadzone doświadczenie potwierdziło pożądane właściwości obu związków odpowiadające lekom antypsychotycznym oraz wykazało, że związek CPL500036 wykazuje aktywność w niższych dawkach niż CPL500012.

## 4.2 Charakterystyka związku wiodącego CPL500036

W wyniku przeprowadzonych doświadczeń związkiem wiodącym w projekcie został wybrany inhibitor CPL500036. Związek ten charakteryzuje się wysoką aktywnością względem PDE10A ( $IC_{50}$  równe  $0,04 \mu M$ ) i wykazuje selektywność względem innego enzymu z rodziny fosfodiesteraz - PDE1C. CPL500036 posiada wysoką stabilność metaboliczną oraz obiecujący profil farmakokinetyczny u szczura, wykazując biodostępność po podaniu dożołądkowym i zdolność do penetracji bariery krew-mózg. Ponadto podanie szczurom związku CPL500036 skutkowało zwiększoną fosforylacją GluR1, co może wynikać z podwyższonego stężenia nukleotydów w prążkowie szczurzym.

Kolejnym etapem w procesie rozwoju leku (patrz 1.5) jest charakterystyka związku wiodącego. Z tego powodu badania prowadzone w kolejnej fazie projektu koncentrowały się na badaniach związku CPL500036 pod kątem właściwości farmakokinetycznych i farmakodynamicznych.

W pierwszej kolejności zostały wykonane rozszerzone badania farmakokinetyczne inhibitora u szczurów po podaniu dożylnym i dożołądkowym umożliwiające wyznaczenie parametrów farmakokinetycznych w zależności od dawki i w pełnym zakresie czasowym ekspozycji. Kolejno zostały wykonane badania farmakodynamiczne badające wpływ podania CPL500036 na stężenie cyklicznych nukleotydów oraz na ekspresję wybranych markerów genów wczesnej odpowiedzi w prążkowie, hipokampie i korze mózgowej. Profil farmakodynamiczny CPL500036 został porównany do związków referencyjnych MP-10 oraz TAK-063. W przeciwieństwie do badań przesiewowych zaprezentowanych w rozdziale 4.1, porównanie zostało rozszerzone o związek TAK-063 – inhibitor PDE10A firmy Takeda, którego struktura została ujawniona w trakcie wykonywania projektu, umożliwiając wykorzystanie tej cząsteczki jako związku referencyjnego (Kunitomo *i in.*, 2014).

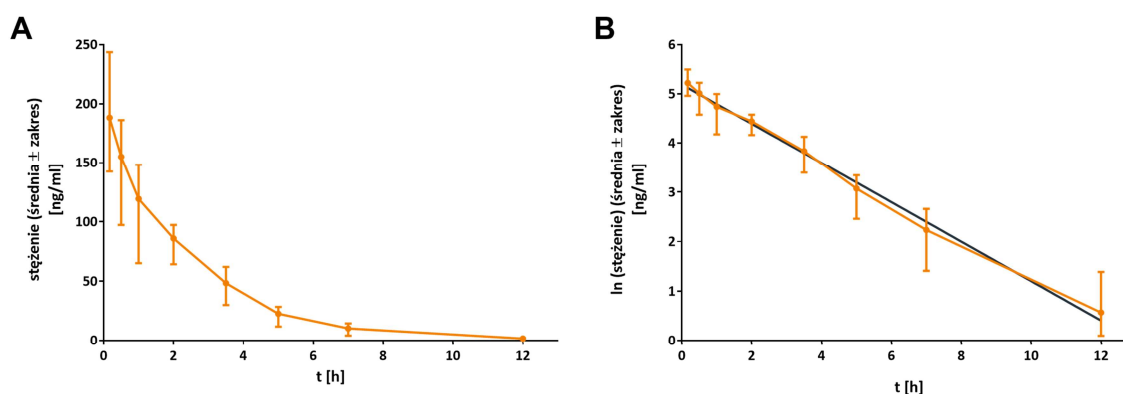
## 4.2.1 Farmakokinetyka

### 4.2.1.1 Analiza parametrów farmakokinetycznych u szczura po podaniu dożylnym

Badanie farmakokinetyczne po podaniu dożylnym zostało wykonane na pięciu samcach szczurów, którym został podany związek CPL500036 w stężeniu 0,3 mg/kg. Krew została pobrana przyżyciowo w ośmiu punktach czasowych w czasie od 10 min do 12 h od podania celem oznaczenia stężenia związków w osoczu. Podanie, uśmiercenie oraz pobranie tkanek zostało zlecone Trójmiejskiej Akademickiej Zwierzętarńi Doświadczalnej Centrum Badawczo-Usługowego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Pomiar stężeń związków został wykonany przez Laboratorium Bioanaliz firmy Celon Pharma S.A.

Uzyskane wyniki zostały zaprezentowane na Rycinie 9 zarówno w skali nominalnej jak i półlogarytmicznej. Wyniki zaprezentowane w skali nominalnej prezentują krzywą charakterystyczną dla podania dożylnego z maksymalnym stężeniem w pierwszym punkcie pobrania krwi wynoszącym  $188,15 \pm 37,27$  ng/ml a najniższym stężeniem w ostatnim punkcie pomiarowym. W ostatnim punkcie czasowym, 12h po podaniu związku, obserwuje się resztkowe stężenia wynoszące  $1,64 \pm 1,34$  ng/ml. Ze względu na dopasowanie liniowego modelu regresji do wyników zaprezentowanych na skali półlogarytmicznej (Rycina 9 B), do obliczeń wykorzystano jednokompartментowy model obliczeń farmakokinetycznych. Stała eliminacji ( $k_{el}$ ) wynosi 0,42 1/h, czas połowicznej eliminacji związku z organizmu ( $t_{1/2}$ ) 1,68 h, przewidywane stężenie początkowe ( $C_p0$ ) jest równe 186,84 ng/ml, wartość klirensu całkowitego ( $Cl_{tot}$ ) 0,66 l/(g\*kg) a objętość dystrybucji ( $V_D$ ) wynosi 1,62 l/kg. Wyniki parametrów zostały podsumowane w Tabeli 14.





Rycina 9 **Profil farmakokinetyczny związku CPL500036 w osoczu szczurów, którym podano związek dożylnie w dawce 0,3 mg/kg (n = 5).** A) Wykres przedstawia zależność stężenia (ng/ml) związku w osoczu od czasu. Pobranie krwi do analizy stężeń zostało wykonane przyżyciowo. Wyniki przedstawiają średnie wartości  $\pm$  zakres. B) Profil farmakokinetyczny związku CPL500036 w osoczu szczurów na wykresie półlogarytmicznym. Kolorem szarym została naniesiona prosta regresji liniowej. Wyniki przedstawiają średnie wartości  $\pm$  zakres.

Tabela 14 **Parametry farmakokinetyczne związku CPL500036 po podaniu dożylnym szczurom w dawce 0,3 mg/kg.**  $C_{max}$  – osiągnięte stężenie maksymalne,  $t_{max}$  – czas osiągnięcia stężenia maksymalnego,  $AUC_{(0-t)}$  – pole powierzchni pod krzywą w czasie 0 min do ostatniego punktu pomiarowego,  $AUC_{(0-inf)}$  – pole powierzchni pod krzywą w czasie 0 min do nieskończoności,  $C_p0$  – stężenie początkowe,  $Cl_{tot}$  – klirens całkowity,  $V_D$  – objętość dystrybucji. N = 5

Dawka		0,3 mg/kg
Droga podania		iv
Parametr	Jednostka	Wartość $\pm$ SD
$AUC_{(0-t)}$	$\mu\text{g} \cdot \text{h/l}$	475,78 $\pm$ 109,58
$AUC_{(0-inf)}$	$\mu\text{g} \cdot \text{h/l}$	480,16 $\pm$ 121,71
$k_{el}$	1/h	0,42 $\pm$ 0,06
$t_{1/2}$	h	1,68 $\pm$ 0,25
$C_{max}$	ng/ml	188,15 $\pm$ 37,27
$t_{max}$	h	0,17
$C_p0$	ng/ml	186,84 $\pm$ 32,54
$Cl_{tot}$	l/(h*kg)	0,66 $\pm$ 0,18
$V_D$	l/kg	1,62 $\pm$ 0,28

#### 4.2.1.2 Podanie doustne wzrastających dawek CPL500036

Druga część badania farmakokinetycznego obejmowała podanie związku drogą dożołądkową we wzrastających stężeniach. CPL500036 został podany samcom szczurów w dawkach 0,75 mg/kg, 1,5 mg/kg, 3 mg/kg, 6 mg/kg. Krew była pobierana przyżyciowo w ośmiu punktach czasowych w czasie od 15 min do 24h od podania celem oznaczenia stężenia związków w osoczu. Podanie, uśmiercenie oraz pobranie tkanek zostało zlecone Trójmiejskiej Akademickiej Zwierzętarńi Doświadczalnej Centrum Badawczo-Usługowego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Pomiar stężeń związków został wykonany przez Laboratorium Bioanaliz firmy Celon Pharma S.A.

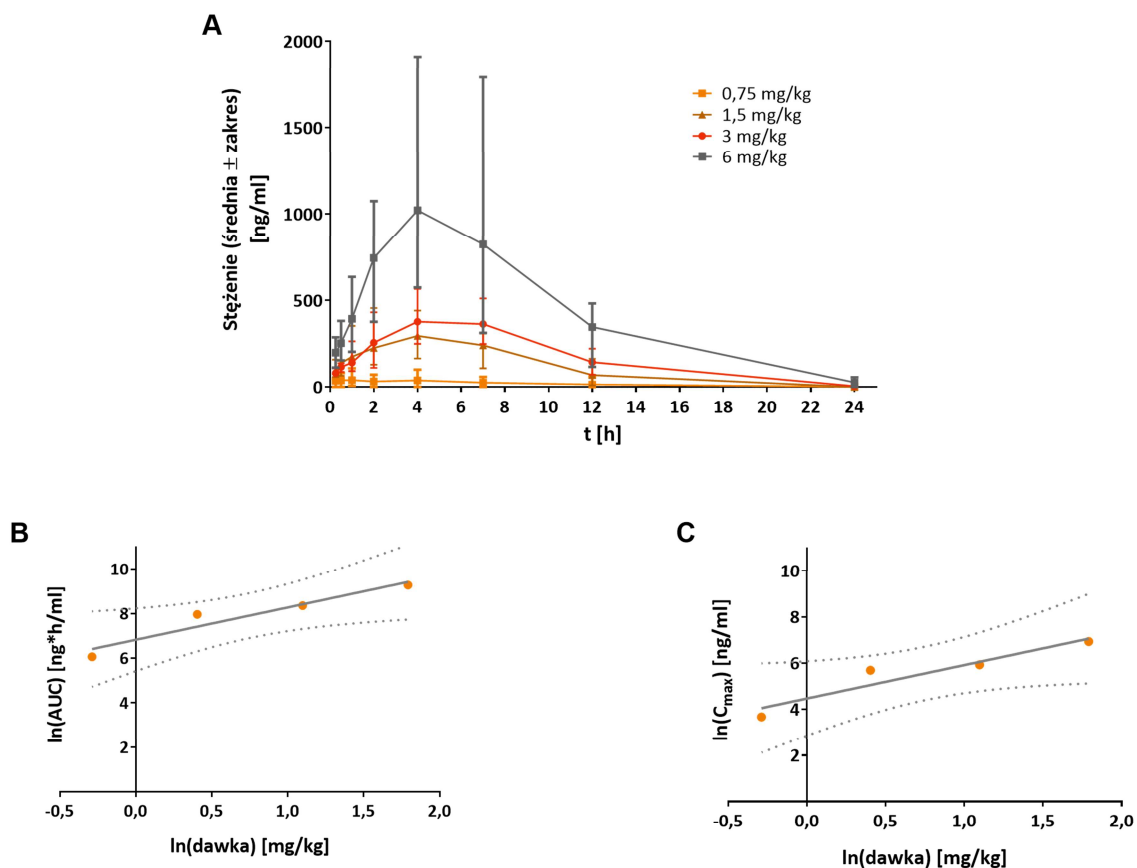
Analiza uzyskanych stężeń potwierdziła dostępność związku w organizmie dla każdej z podanych dawek (Rycina 10 A). Profil krzywych farmakokinetycznych przebiega charakterystycznie dla podania dożołądkowego z wyraźnie zarysowaną częścią wchłaniania, dystrybucji i eliminacji. Jedynie krzywa dla najniższej dawki 0,75 mg/kg prezentuje odmienny przebieg, zwłaszcza w części odpowiadającej wchłanianiu, która nie jest wyraźnie zarysowana, co najprawdopodobniej wynika z limitu detekcji dla niskich stężeń związku.

Parametry farmakokinetyczne po podaniu dożołądkowym zostały zaprezentowane w Tabeli 15. Stężenia maksymalne osiągają wartości w przedziale od 39,32 do 1021,74 ng/ml w czasie 4h od podania za wyjątkiem najniższej podanej dawki, dla której są one osiągane po 1h. Wartości ekspozycji ( $AUC_{(0-inf)}$ ) wynoszą od 428 do 10532  $\mu\text{g}\cdot\text{h/l}$ . Na potencjał do akumulacji związku lub długotrwałej retencji w organizmie mogą wskazywać wysokie stężenia analitu w 24h po podaniu cząsteczki. CPL500036 nie wykazywał takich właściwości u szczurów, ponieważ, w ostatnim punkcie pomiarowym obserwowano brak lub niskie dawki związku ( $26,04 \pm 20,61$  mg/kg dla najwyższej podanej dawki).

Biodostępność związku dla dawek 1,5, 3 oraz 6 mg/kg wynosi 88-119%, co wskazuje na bardzo dobrą biodostępność CPL500036 po podaniu dożołądkowym. Jedynie biodostępność dla najniższej dawki przyjmuje niską wartość wynoszącą 36%.

Proporcjonalność wzrostu ekspozycji ( $AUC_{(0-inf)}$ ) oraz stężenia maksymalnego ( $C_{max}$ ) została przeanalizowana metodą zaprezentowaną przez Smith *i in.* (2000). Zakłada ona, że jeżeli nachylenie krzywej, uwzględniając przedział ufności, powstałej w wyniku regresji liniowej dla logarytmu naturalnego ekspozycji lub stężenia maksymalnego w zależności od logarytmu naturalnego dla podanych dawek wynosi 1, to ekspozycja lub stężenie maksymalne

wzrastają liniowo. W przypadku wykonanego eksperymentu, nachylenie prostej regresji liniowej dla analizowanych ekspozycji wyniosła 1,45 (0,14-2,75) a dla analizowanych stężeń maksymalnych 1,45 (-0,05-2,94). W obu przypadkach 95% przedziały ufności zawierają możliwość przyjęcia przez nachylenia wartości 1 (Rycina 10 B,C).



Rycina 10 Profil farmakokinetyczny związku CPL500036 w osoczu szczurów, którym podano związek dożołądkowo w dawkach 0,75, 1,5, 3 i 6 mg/kg (n=5). A) Wykres zależności stężenia (ng/ml) związku w osoczu od czasu. Pobranie krwi do analizy stężeń zostało wykonane przyżyciowo. Wyniki przedstawiają średnie wartości  $\pm$  zakres. B) Profil farmakokinetyczny związku CPL500036 w osoczu szczurów na wykresie półlogarytmicznym. Kolorem szarym została naniesiona prosta regresji liniowej celem określenia proporcjonalności wzrostu ekspozycji ( $AUC_{(0-inf)}$ ) oraz stężenia maksymalnego ( $C_{max}$ ) metodą Smith *in. (2000)*.

Tabela 15 Wybrane parametry farmakokinetyczne związku CPL500036 na podstawie przeprowadzonego farmakokinetycznego badania po podaniu dożołądkowym dawek 0,75-6 mg/kg u szczurów.  $C_{max}$  – osiągnięte stężenie maksymalne,  $t_{max}$  – czas osiągnięcia stężenia maksymalnego,  $AUC_{(0-t)}$  – pole powierzchni pod krzywą w czasie 0 min do ostatniego punktu pomiarowego,  $AUC_{(0-inf)}$  – pole powierzchni pod krzywą w czasie 0 min do nieskończoności, F – biodostępność.

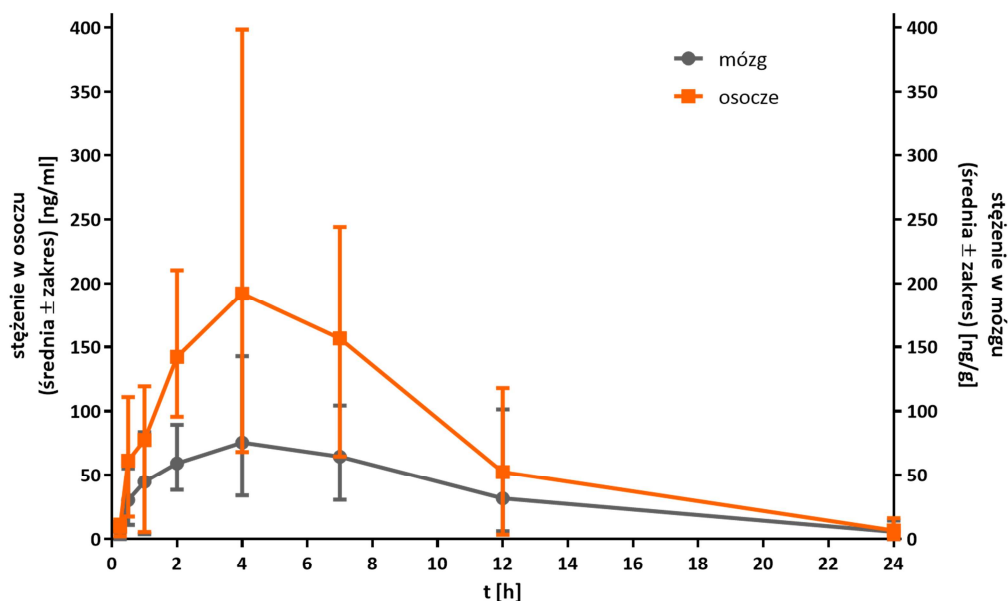
Dawka		0,75 mg/kg	1,5 mg/kg	3 mg/kg	6 mg/kg
Droga podania		po			
Parametr	Jednostka	Wartość $\pm$ SD			
$C_{max}$	ng/ml	39,32 $\pm$ 36,33	295,20 $\pm$ 98,89	375,56 $\pm$ 119,92	1021,74 $\pm$ 464,57
$T_{max}$	h	1	4	4	4
$AUC_{(0-t)}$	$\mu\text{g}\cdot\text{h/l}$	426 $\pm$ 431	2838 $\pm$ 540	4204 $\pm$ 255	10532 $\pm$ 3482
$AUC_{(0-inf)}$	$\mu\text{g}\cdot\text{h/l}$	428 $\pm$ 427	2838 $\pm$ 540	4217 $\pm$ 269	10596 $\pm$ 3509
F	%	36 $\pm$ 37	119 $\pm$ 36	88 $\pm$ 21	111 $\pm$ 45

#### 4.2.1.3 Podanie doustne wraz z analizą biodostępności w mózgu

Docelowym narządem, w którym CPL500036 ma wykazać działanie farmakodynamiczne, jest mózg. Celem zbadania przenikania bariery krew-mózg oraz przeanalizowania biodostępności związku w tym narządzie, związek CPL500036 został podany dożołądkowo samcom szczurów w dawce 3 mg/kg. Zwierzęta były uśmiercane w ośmiu punktach czasowych od 15 min do 24 h od podania celem pobrania krwi oraz mózgu. Podanie, uśmiercenie oraz pobranie zostało wykonane przez personel Trójmiejskiej Akademickiej Zwierzętarni Doświadczalnej Centrum Badawczo-Usługowego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Pomiar stężeń związków został wykonany przez Laboratorium Bioanalityczne firmy Celon Pharma S.A.

Zależność stężenia związku w osoczu od czasu (Rycina 11) ma podobny przebieg jak to miało miejsce w doświadczeniu opisanym w rozdziale 4.1.5.1. Zależność stężenia związku w mózgu od czasu ma przebieg silnie zbliżony do przebiegu stężenia w osoczu. Maksymalne stężenie osiągnięte jest po 4h i wynosi odpowiednio 192,13 ng/ml dla osocza oraz 75,52 ng/g dla mózgu (Tabela 16). Związek w kolejnych punktach pomiarowych jest eliminowany z obu kompartmentów. Ekspozycja na lek w osoczu ( $AUC_{(0-inf)}$ ) wyniosła 1907,13  $\mu\text{g}\cdot\text{h/l}$ , natomiast w mózgu 899,94  $\mu\text{g}\cdot\text{h/l}$ . Parametrem opisującym relacje ekspozycji na związek w mózgu w stosunku do ekspozycji w osoczu, jest parametr B/P. Może on zostać wyznaczony zarówno względem ekspozycji AUC jak i osiągniętych stężeń maksymalnych. W przypadku związku

CPL500036 wynosi on od 0,47 dla  $AUC_{(0-inf)}$  i 0,39 dla  $C_{max}$ . Potwierdza to dobrą penetrację bariery krew-mózg przez ten inhibitor i osiągnięcie ekspozycji w mózgu.



Rycina 11 **Profil farmakokinetyczny związku CPL500036 w osoczu oraz w mózgu szczurów, którym podano związek dożyłdtkowo w dawce 3 mg/kg (n=4/punkt czasowy)**. Wykres przedstawia zależność stężenia związku w osoczu (ng/ml) lub mózgu (ng/g) od czasu. Lewa oś rzędnych przedstawia stężenie związku w jednostkach ng/ml osocza. Prawa oś rzędnych przedstawia stężenie związku w mózgu w jednostkach ng/g tkanki. Wyniki przedstawiają średnie wartości  $\pm$  zakres.

Tabela 16 **Wybrane parametry farmakokinetyczne związku CPL500036 w kompartmentie mózgowym oraz w osoczu na podstawie przeprowadzonego farmakokinetycznego badania po podaniu dożyłdtkowym u szczurów**:  $C_{max}$  – osiągnięte stężenie maksymalne,  $t_{max}$  – czas osiągnięcia stężenia maksymalnego,  $AUC_{(0-t)}$  – pole powierzchni pod krzywą w czasie 0 min do ostatniego punktu pomiarowego,  $AUC_{(0-inf)}$  – pole powierzchni pod krzywą w czasie 0 min do nieskończoności,  $C_p0$  – stężenie początkowe,  $B/P_{AUC}$  - stosunek stężenia w mózgu do stężenia w osoczu obliczony na podstawie ekspozycji  $AUC_{(0-t)}$   $B/P_{t_{max}}$  - stosunek stężenia w mózgu do stężenia w osoczu dla stężeń maksymalnych.

Dawka		3 mg/kg	
Droga podania		po	
Kompartment		Osocze	Mózg
Parametr	Jednostka	Wartość $\pm$ SD	
$C_{max}$	ng/ml / ng/g	192,13 $\pm$ 124,04	75,52 $\pm$ 40,89
$T_{max}$	h	4h	4h
$AUC_{(0-t)}$	$\mu\text{g}\cdot\text{h/l}$	1891,14 $\pm$ 505,71	886,36 $\pm$ 334,40
$AUC_{(0-inf)}$	$\mu\text{g}\cdot\text{h/l}$	1907,13 $\pm$ 503,56	899,94 $\pm$ 340,84
$B/P_{AUC}$	-	0,47	
$B/P_{C_{max}}$	-	0,39	

## 4.2.2 Farmakodynamika

### 4.2.2.1 Analiza stężeń cyklicznych nukleotydów w różnych strukturach mózgu szczura po podaniu CPL500036

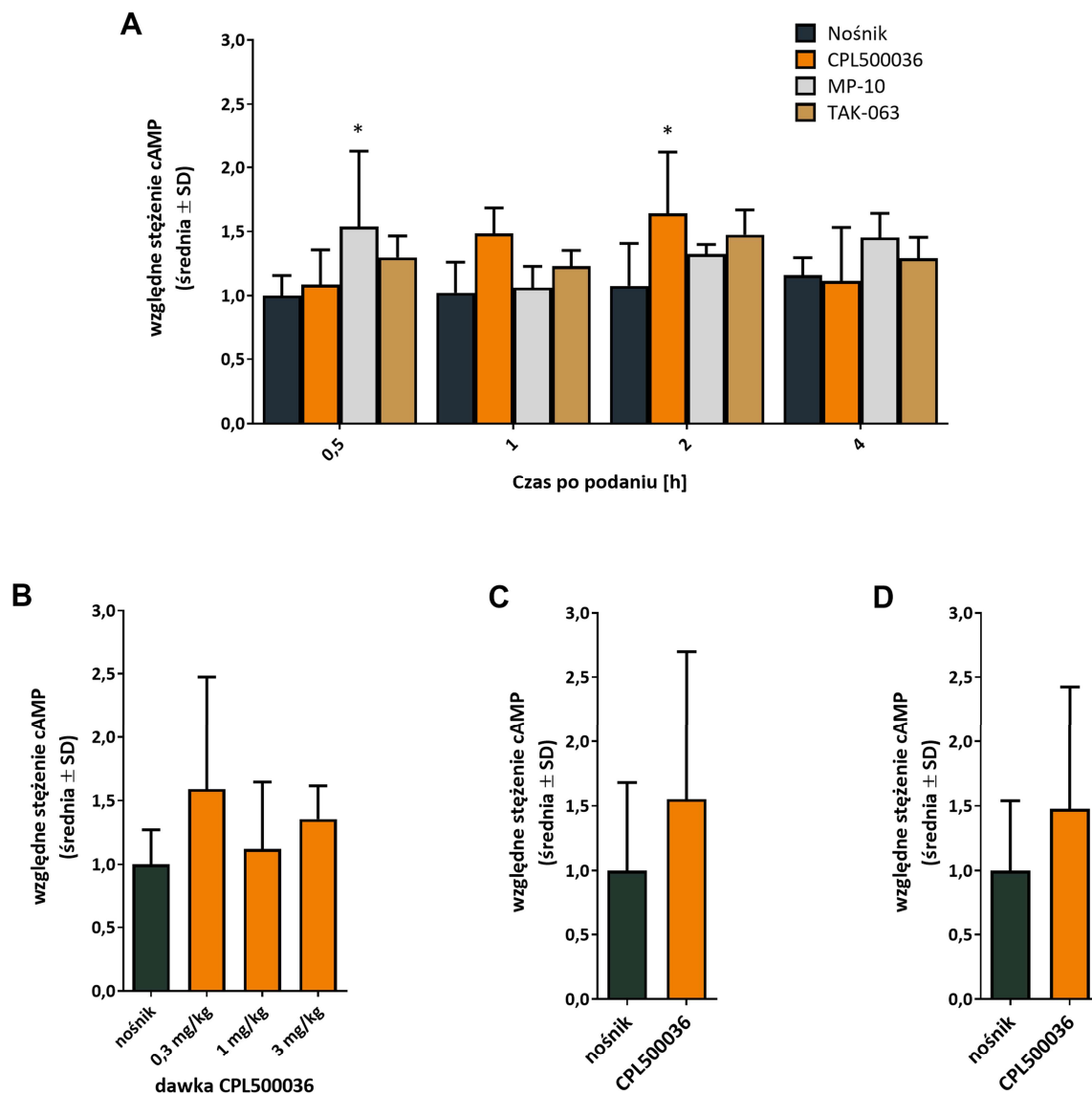
Analiza farmakokinetyczna wskazała dostępność związku po podaniu dożołądkowym zarówno w osoczu jak i w mózgu. Po osiągnięciu terapeutycznego stężenia w mózgu, inhibicja PDE10A powinna skutkować podwyższonym stężeniem cyklicznych nukleotydów w średnich neuronach kolczastych w prążkowiu. W związku z powyższym zbadano wpływ podania CPL500036 na poziom cyklicznych nukleotydów cAMP oraz cGMP w prążkowiu.

Podanie, uśmiercenie i izolowanie struktur mózgu została wykonana przez personel Zakładu Farmakologii Doświadczalnej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN pod kierownictwem prof. Pawła Grieba. Samcom szczurów podano doustnie inhibitory PDE10A: CPL500036 i TAK-063 w dawce 3 mg/kg oraz MP-10 w dawce 10 mg/kg lub nośnik dla związku CPL500036. Zwierzęta zostały uśmiercone 0,5h, 1h, 2h oraz 4h po podaniu substancji przez zastosowanie skupionej wiązki mikrofal. Następnie wyizolowane zostały prążkowie, kora przedczołowa i hipokamp. Pomiar stężenia cAMP oraz cGMP w ekstraktach ze struktur mózgowych wykonano metodą ELISA.

Istotnie statystyczny wzrost stężenia cAMP w prążkowiu zaobserwowano dla CPL500036 2h po podaniu związku oraz dla MP-10 0,5h po podaniu (Rycina 12 A). W przypadku cGMP istotnie statystyczny wzrost tego cyklicznego nukleotydu w prążkowiu został zaobserwowany dla CPL500036 2h po podaniu związku (Rycina 13 A). Dla TAK-063 nie zaobserwowano zmian statystycznie istotnych dla żadnego z cyklicznych nukleotydów.

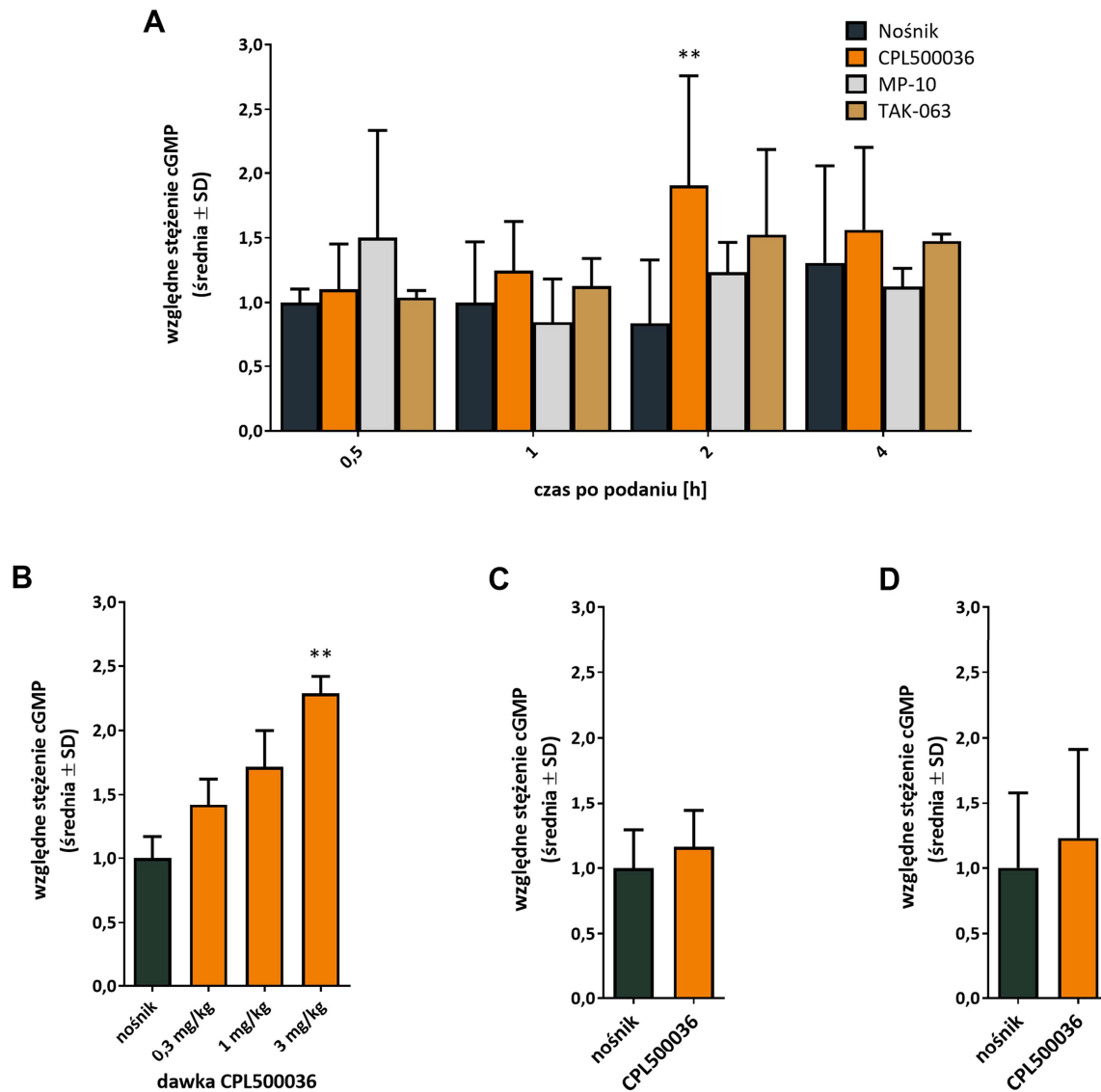
W kolejnym kroku zbadano dawkozależność podania CPL500036 na poziom cyklicznych nukleotydów w prążkowiu i w tym celu podano szczurom związek w dawkach 0,3 mg/kg, 1 mg/kg oraz 3 mg/kg. Punkt czasowy 2h po podaniu związku dla wykonania analiz został wybrany ze względu na zaobserwowanie statystycznie istotnego wzrostu stężenia cAMP i cGMP w prążkowiu we wcześniejszym doświadczeniu analizującym stężenie cyklicznych nukleotydów w zależności od czasu. Grupę kontrolną dla eksperymentu stanowiły szczury po podaniu nośnika. Analiza wykonana dla cAMP wykazała brak istotnych różnic pomiędzy grupą kontrolną a grupami, którym podano inhibitor w różnych dawkach (Rycina 12 B). Natomiast pomiar stężenia cGMP w prążkowiu wykazał wzrost stężenia wraz ze wzrastającą dawką inhibitora osiągając istotnie statystyczną różnicę pomiędzy grupą kontrolną a grupą, której podano związek w dawce 3 mg/kg (Rycina 13 A).

Celem potwierdzenia, że obserwowany efekt występuje specyficznie w prążkowie, poddano analizie ekstrakty uzyskane z kory przedczołowej oraz hipokampu szczurów uśmierconych 2h po podaniu CPL500036 w dawce 3 mg/kg. Zarówno dla cAMP jak i cGMP w obu strukturach nie zaobserwowano różnic istotnie statystycznych potwierdzając w ten sposób, że obserwowany wzrost cyklicznych nukleotydów ograniczony jest do prążkowie (Rycina 12 C i D, Rycina 13 C i D).



Rycina 12 **Analiza stężeń cAMP w ekstraktach z wybranych struktur mózgu szczura w zależności od czasu od podania inhibitorów PDE10A oraz od podanej dawki CPL500036.** A) Analiza stężenia cAMP w ekstraktach prążkowiec szczurów 0,5h, 1h, 2h i 4h po podaniu związku CPL500036 (3 mg/kg), MP-10 (10 mg/kg) oraz TAK-063 (3 mg/kg) wykazała istotny wzrost dla MP-10 po 0,5h i 2h po podaniu dla CPL500036. Pomiar został wykonany metodą ELISA. Grupę kontrolną stanowiły zwierzęta, którym podano nośnik. Wyniki zostały przedstawione w odniesieniu do grupy otrzymującej nośnik i uśrednionej 0,5h po podaniu  $\pm$  SD ( $n = 4$ ). Zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji z testem post-hoc Dunetta. B) Analiza stężenia cAMP w ekstraktach prążkowiec szczurów po podaniu związku CPL500036 w dawce 0,3, 1 lub 3 mg/kg. Pomiar został wykonany metodą ELISA. Grupę kontrolną stanowiły zwierzęta, którym podano nośnik. Wyniki zostały przedstawione w odniesieniu do grupy otrzymującej nośnik  $\pm$  SD ( $n = 4$ ). Zastosowano nieparametryczny test Kruskala-Wallisa z testem post-hoc Dunna. C) Analiza stężenia cAMP w ekstraktach kory przedczołowej szczurów po podaniu związku CPL500036 w dawce 3 mg/kg. Pomiar został wykonany metodą ELISA. Grupę kontrolną stanowiły zwierzęta, którym podano nośnik. Wyniki zostały przedstawione w odniesieniu do grupy otrzymującej nośnik  $\pm$  SD ( $n = 4$ ). D) Analiza stężenia cAMP w ekstraktach hipokampu szczurów po podaniu związku CPL500036 w dawce 3 mg/kg. Pomiar został wykonany metodą ELISA. Grupę kontrolną stanowiły zwierzęta, którym podano nośnik. Wyniki zostały przedstawione w odniesieniu do grupy otrzymującej nośnik  $\pm$  SD ( $n = 4$ ). \* $p < 0,05$ .



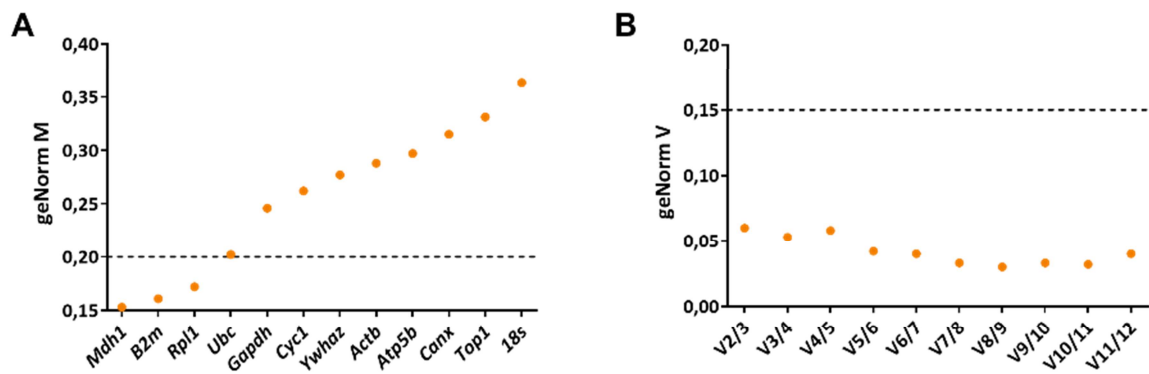


Rycina 13 Analiza stężeń cGMP w ekstraktach z mózgu szczurów w zależności od czasu od podania inhibitorów PDE10A oraz od podanej dawki CPL500036. A) Analiza stężenia cGMP w ekstraktach prążkowiec szczurów po podaniu związku CPL500036 (3 mg/kg), MP-10 (10 mg/kg) oraz TAK-063 (3 mg/kg) w 0,5, 1, 2, 4h po podaniu związków. Pomiar został wykonany metodą ELISA. Grupę kontrolną stanowiły zwierzęta, którym podano nośnik. Wyniki zostały przedstawione w odniesieniu do grupy otrzymującej nośnik i uśmierconej 0,5h po podaniu ± SD (n = 4). Zastosowano dwuczynnikową analizę z testem post-hoc Dunetta. B) Analiza stężenia cGMP w ekstraktach prążkowiec szczurów po podaniu związku CPL500036 w dawce 0,3, 1 lub 3 mg/kg. Pomiar został wykonany metodą ELISA. Grupę kontrolną stanowiły zwierzęta, którym podano nośnik. Wyniki zostały przedstawione w odniesieniu do grupy otrzymującej nośnik ± SD (n = 4). Zastosowano nieparametryczny test Kruskala-Wallisa z testem post-hoc Dunna. C) Analiza stężenia cGMP w ekstraktach kory przedczołowej szczurów po podaniu związku CPL500036 w dawce 3 mg/kg. Pomiar został wykonany metodą ELISA. Grupę kontrolną stanowiły zwierzęta, którym podano nośnik. Wyniki zostały przedstawione w odniesieniu do grupy otrzymującej nośnik ± SD (n = 4). D) Analiza stężenia cGMP w ekstraktach hipokampu szczurów po podaniu związku CPL500036 w dawce 3 mg/kg. Pomiar został wykonany metodą ELISA. Grupę kontrolną stanowiły zwierzęta, którym podano nośnik. Wyniki zostały przedstawione w odniesieniu do grupy otrzymującej nośnik ± SD (n = 4). \*\*p < 0,01.

#### 4.2.2.1 Analiza poziomów ekspresji wybranych genów po podaniu inhibitorów PDE10A u szczura

##### 4.2.2.1.1 Wybór genów referencyjnych

Przed rozpoczęciem prac związanych z analizą ekspresji genów niezbędne jest wybranie genów referencyjnych umożliwiających prawidłową i możliwie najczulszą analizę. Do momentu wykonania doświadczeń brak było informacji literaturowych o genach ulegających stabilnej ekspresji w komórkach prążkowania szczurzego, których aktywność nie byłaby regulowana przez podanie związków wpływających na ścieżki sygnałowe zależne od receptorów dopaminowych. Z tego względu wykonano doświadczenie mające na celu wybór odpowiednich genów referencyjnych do analiz ilościowych wykonanych metodą qRT-PCR. Podanie, uśmiercenie i izolowanie struktur mózgu została wykonana przez personel Zakładu Farmakologii Doświadczalnej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN. Szczurom zostały podane następujące związki: inhibitor PDE10A – CPL500036 (3 mg/kg, podanie dożołądkowe), antagonist receptoru D2 – haloperidol (1 mg/kg, podanie dootrzewnowe), agonista receptoru D1 – SKF82958 (2 mg/kg, podanie dootrzewnowe) oraz nośnik (roztwór 0,5% metylocelulozy i 2% Tween 80). Zwierzęta uśmiercono 4h od podania związków przez zastosowanie skupionej wiązki mikrofal. Ekspresja genów w wyizolowanym materiale z prążkowania zwierząt została przeanalizowana za pomocą techniki qRT-PCR oraz algorytmu GeNorm (Strick *i in.*, 2010). Analizie ekspresji poddano 12 kandydatów na gen referencyjny: *Mdh1*, *B2m*, *Rpl1*, *Ubc*, *Gapdh*, *Cyc1*, *Ywhaz*, *Actb*, *Atp5b*, *Canx*, *Top1*, *18s*. Stabilność ekspresji została zaprezentowana przy pomocy parametru średniej stabilności geNorm M (Rycina 14 A). Wartość tego parametru poniżej lub równa 0,2 wskazuje na bardzo wysoką stabilność ekspresji danego genu. W przypadku wykonanego doświadczenia taką wartość uzyskano dla genów *Mdh1*, *B2m* oraz *Rpl1*. Liczbę genów, które powinny zostać wykorzystane do analiz ekspresji genów, wskazuje parametr geNorm V (Rycina 14 B). Jeśli wartość geNorm V wynosi poniżej 0,15 dla danego porównania wariacji liczby genów referencyjnych, dodatkowe geny referencyjne nie są wymagane. W przypadku wykonanego doświadczenia wartość geNorm V wyniosła 0,06 dla V2/3 co oznacza, że dwa geny referencyjne: *Mdh1* i *B2m* powinny zostać wykorzystane w analizach ekspresji genów.



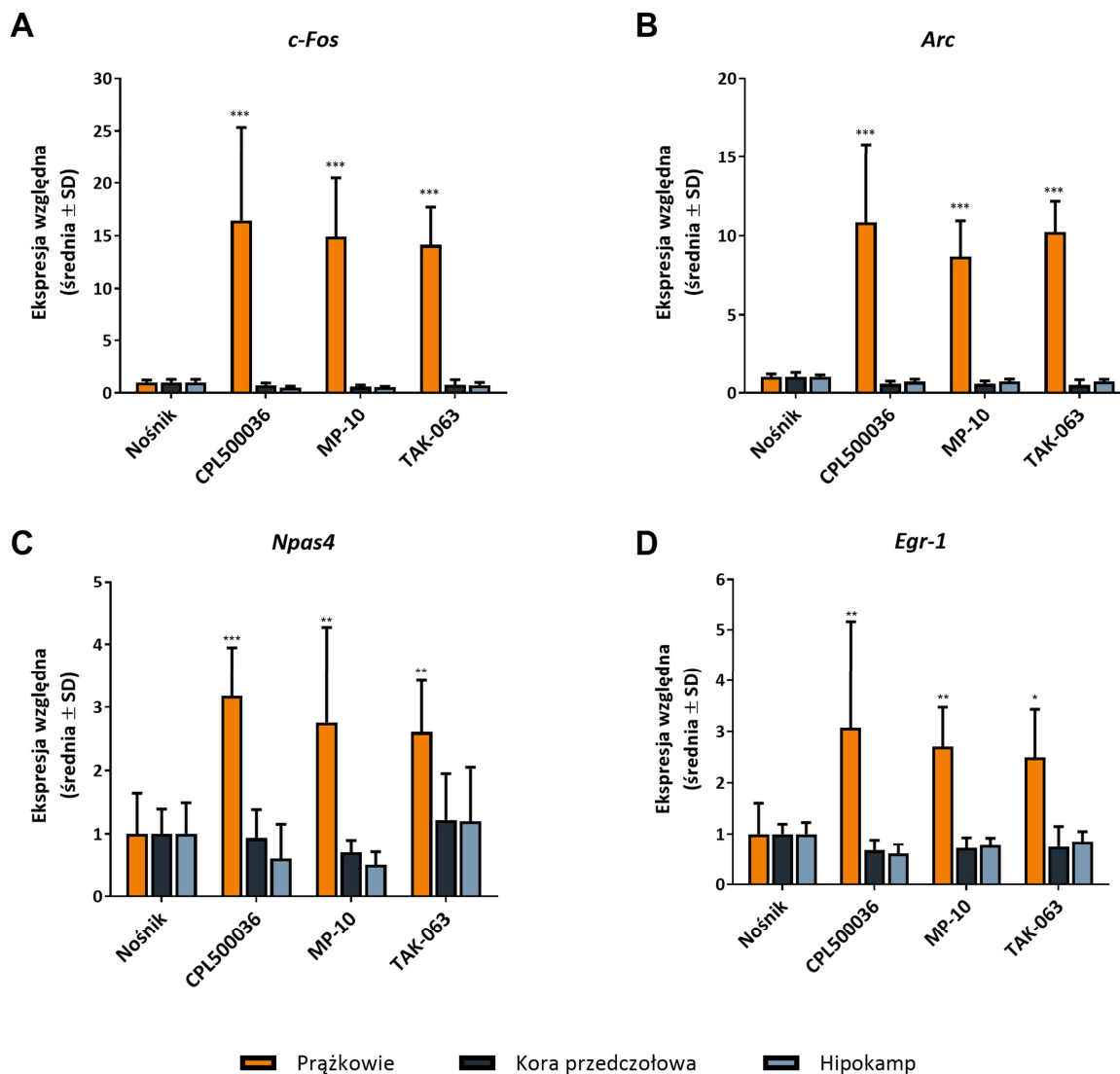
Rycina 14 Analiza stabilności ekspresji dla 12 genów celem wyboru genów referencyjnych dla prądkowia szczura. A) parametr średniej stabilności geNorm M. Wysoką stabilność ekspresji wykazują *Mdh1*, *B2m* oraz *Rpl1*. Linia przerywana wskazuje wartość geNorm M = 0,20 oznaczającą punkt odcięcia dla wysokiej stabilności genów referencyjnych. B) Parametr geNorm V sugerujący liczbę genów referencyjnych wymaganych do analizy ekspresji metodą qRT-PCR. Linia przerywana wskazuje wartość geNorm V = 0,15 oznaczającą punkt odcięcia dla liczby genów niezbędnych do analizy.

#### 4.2.2.1.2 Analiza ekspresji genów wczesnej odpowiedzi w różnych strukturach mózgu po traktowaniu inhibitorami PDE10A

Inhibicja PDE10A prowadzi do aktywacji transkrypcji genów wczesnej odpowiedzi w wyniku aktywacji ścieżki sygnałowej zależnej od stężenia cyklicznych nukleotydów (patrz 1.3.3). Geny wczesnej odpowiedzi są markerem aktywności neuronów a ich aktywacja prowadzi do długotrwałych zmian adaptacyjnych. W związku z tym postanowiono sprawdzić ekspresję *c-Fos*, *Arc*, *Npas4* oraz *Erg-1* w prążkowie oraz wykazać specyficzność aktywacji poprzez porównanie ekspresji w korze mózgowej i hipokampie po zahamowaniu aktywności enzymu związkiem CPL500036 i związkami referencyjnymi MP-10 i TAK-063.

Analiza ekspresji genów wczesnej odpowiedzi została wykonana u samców po podaniu dożołądkowym inhibitorów PDE10A: CPL500036 i TAK-063 w dawce 3 mg/kg oraz MP-10 w dawce 10 mg/kg, a grupę kontrolną stanowił nośnik dla związku CPL500036. Zwierzęta zostały uśmiercone 4h po podaniu substancji za pomocą skupionej wiązki mikrofal. Podanie, uśmiercenie i izolowanie struktur mózgu została wykonana przez personel Zakładu Farmakologii Doświadczalnej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN pod kierownictwem prof. Pawła Grieba. Następnie wyizolowano mRNA z prążkowie, kory przedczołowej i hipokampu, który wykorzystano do dwukrotnej, niezależnej syntezy cDNA. Uzyskany w ten sposób materiał został dwukrotnie poddany analizie metodą qRT-PCR zgodnie z wytycznymi dotyczącymi minimum informacji wymaganych do publikacji danych z eksperymentów qRT-PCR (MIQE, ang. *Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*). Uzyskane wyniki były normalizowane do genów *Mdh1* oraz *B2m*.

Wykazano, że podanie inhibitorów PDE10A: CPL500036, MP-10 oraz TAK-063 powoduje silny i istotnie statystyczny wzrost transkrypcji genów wczesnej odpowiedzi: *c-Fos*, *Arc*, *Npas4* oraz *Erg-1* w prążkowie (Rycina 15). Nie zaobserwowano znaczących różnic pomiędzy związkami. Celem weryfikacji specyficzności odpowiedzi analizie poddano również korę przedczołową i hipokamp. Dla żadnej z tych struktur i dla żadnego badanego genu nie zaobserwowano istotnego wzrostu transkrypcji.



Rycina 15 Analiza ekspresji genów *c-Fos*, *Arc*, *Egr-1* i *Npas4* w prążkowie, korze przedczołowej oraz hipokampie szczurzym po podaniu CPL500036 lub związków referencyjnych MP-10 i TAK-063. Analiza ekspresji genów w prążkowie wykazała statystycznie istotne zwiększenie transkrypcję genów *c-Fos* (A), *Arc* (B), *Egr-1* (C) i *Npas4* (D) u zwierząt po podaniu inhibitorów PDE10A. Zmian nie zaobserwowano w korze przedczołowej oraz hipokampie. Ekspresja była znormalizowana do genów referencyjnych *Mdh1* oraz *B2m*. Ekspresja względna została przedstawiona jako średnia krotności ekspresji w prążkowie dla grupy kontrolnej. Słupki błędów oznaczają SD. Grupa liczyła n = 4 szczury. Zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji z testem post-hoc Dunetta. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001.

## 5 DYSKUSJA

Głównym celem niniejszej pracy był wybór nowego inhibitora PDE10A i potwierdzenie jego właściwości farmakologicznych wskazujących na potencjał zastosowania związku w terapii schizofrenii. W wyniku przeprowadzonych badań przesiewowych pod kątem aktywnych i selektywnych inhibitorów PDE10A oraz na podstawie analizy wyników stabilności metabolicznej, farmakokinetycznej i farmakodynamicznej wyłoniono strukturę wiodącą CPL500036. CPL500036 wykazywał wysoką aktywność, selektywność i stabilność metaboliczną, penetrował barierę krew-mózg u szczura, a jego podanie skutkowało zwiększoną fosforylacją podjednostki GluR1 receptora AMPA. Szczegółowa charakterystyka farmakokinetyczna wykazała wysoką biodostępność ustrojową i w mózgu oraz dawkozależną ekspozycję. Badania farmakodynamiczne wykazały wzrost stężenia cyklicznych nukleotydów oraz wzrost ekspresji genów wczesnej odpowiedzi w strukturach prążkowania mózgu szczura po dożołądkowym podaniu związku. Uzyskane wyniki potwierdzają odkrycie nowego, innowacyjnego kandydata na lek - inhibitora PDE10A.

### 5.1 Badania przesiewowe w poszukiwaniu nowego inhibitora PDE10A

PDE10A posiada szereg właściwości, które spowodowały, że rozpoczęto prace nad możliwością interwencji farmakologicznej wobec tego enzymu w schorzeniach związanych z jądrami podstawy, w tym przede wszystkim ze schizofrenią. Cechami predysponującymi PDE10A do interwencji farmakologicznej są: centralna rola w regulacji ścieżki sygnałowej zależnej od cyklicznych nukleotydów w średnich neuronach kolczastych, wysoce specyficzna ekspresja w tej populacji komórek oraz unikalna budowa miejsca aktywnego, z kieszenią selektywności występującą jedynie w tym białku (Verhoest *i in.*, 2009; Menniti *i in.*, 2021). Natomiast głównym wyzwaniem w procesie rozwoju leku jest wybór związków aktywnych, które oddziałują z wybranym celem molekularnym w założonym miejscu leczenia, o odpowiednich właściwościach farmakologicznych (tj. o pożądanym profilu farmakokinetycznym i farmakodynamicznym).

Poszukiwania inhibitora PDE10A zostały oparte na starannie dobranej bibliotece związków zaprojektowanych w oparciu o strukturę białka (ang. *target-based*) oraz jego ligandów (ang. *ligand-based*). Na bibliotekę składały się związki będące przedstawicielami 10 chemotypów, wybranych i zsyntetyzowanych po wstępnym, wirtualnym badaniu

przesiewowym (Moszczyński-Pętkowski *i in.*, 2018). Do określenia aktywności *in vitro* związków wybrano metodę enzymatyczną, pozwalającą określić funkcjonalnie zdolność do hamowania aktywności enzymu. Na 23 przekazane związki, 21 było rozpuszczalnych, z których 19 wykazało powinowactwo do PDE10A poniżej 1  $\mu\text{M}$  a 8 poniżej 100 nM, czyli w zakresie związku referencyjnego MP-10, dla którego  $\text{IC}_{50}$  wynosiło w tym teście 90 nM. Grupa cząsteczek o najwyższej aktywności wymagała dalszych analiz w celu wyboru związku wiodącego.

Kandydat na lek oparty na związkach o niskiej masie cząsteczkowej musi również posiadać odpowiedni profil parametrów fizyko-chemicznych, które definiują właściwości związku jako lek. Takie podejście ogranicza zarówno ryzyko wykluczenia danego związku z dalszego rozwoju ze względu na niekorzystne cechy (które mogą się przełożyć na niekorzystną farmakokinetykę czy toksyczność) jak i pozwala na szybszą identyfikację związków wiodących. Celem uwzględnienia tych parametrów w wyborze struktury wiodącej, analizie poddano masę molową, lipofilowość, wartość powierzchniowej polaryzacji, współczynnik podziału logD, liczbę donorów wiązań wodorowych oraz pKa. Wymienione parametry są częścią tzw. reguły Lipinskiego, która określa najbardziej pożądane parametry cząsteczek (Lipinski *i in.*, 2001). W celu umożliwienia zastosowania analizy Pareto (Obayashi *i in.*, 2004), wymienione wyżej parametry zostały opisane wartością wieloparametrowej optymalizacji MPO (Wager *i in.*, 2010). Analiza Pareto, poprzez minimalizację wartości  $\text{IC}_{50}$  i maksymalizację MPO, oraz mając na względzie zapewnienie dużego zróżnicowania strukturalnego doprowadziła do wyboru 8 kandydatów z 5 grup chemotypów.

Celem dalszej charakterystyki potencjalnych substancji leczniczych zlecono doświadczenie z zakresu właściwości ADME poprzez ustalenie klirensu wewnętrznego i połowicznego czasu eliminacji w systemie szczurzych mikrosomów wątrobowych. Komórki wątroby i zawarte w nich białka z grupy cytochromów 450 są w głównej mierze odpowiedzialne za biotransformację prowadzącą do eliminacji ksenobiotyków z organizmu. Doświadczenie oceniające stabilność metaboliczną pozwala na wczesnym etapie wykluczyć związki, których właściwości nie rokują odpowiedniego poziomu stabilności metabolicznej, co mogłoby skutkować zbyt szybką eliminacją związku w organizmie. Przebadana grupa związków prezentowała zróżnicowaną stabilność: od dwukrotnie bardziej niestabilnego niż werapamil (niestabilny związek kontrolny) aż po związek stabilniejszy niż donepezil (stabilny związek kontrolny). Związek referencyjny MP-10 wykazał umiarkowaną stabilność.

Do dalszych badań zakwalifikowano cztery najbardziej stabilne związki, które reprezentowały 3 chemotypy: CPL500012, CPL500020, CPL500032 oraz CPL500036.

Określenie aktywności związków *in vitro*, ich selektywności wobec wybranych białek homologicznych i badanie stabilności metabolicznej stanowią pierwsze kroki selekcji związków, które mogą stać się lekami. Jednak skomplikowane procesy biochemiczne przebiegające w organizmach żywych nie mogą zostać w pełni odwzorowane w doświadczeniach *in vitro* ze względu na niedoskonałość modeli, nieoddających w pełni zachowania związku w organizmie żywym. Z tego względu kolejnym krokiem charakteryzującym potencjalnych kandydatów na lek były badania *in vivo*. Założeniem niniejszego projektu był wybór cząsteczki, której docelową drogą podania jest podanie doustne. Ponadto leki psychiatryczne powinny być zdolne do penetracji bariery krew-mózg celem osiągnięcia stężenia terapeutycznego w mózgu. W związku z powyższym zdecydowano się na podanie dożołądkowe szczurom czterech wybranych związków oraz związku referencyjnego MP-10 celem przeprowadzenia analizy farmakokinetycznej w osoczu oraz w mózgu. Dla wszystkich przebadanych związków wykazano ich obecność w osoczu, co dowodzi skutecznego wchłaniania związków z układu pokarmowego. Wszystkie wybrane cząsteczki osiągnęły wyższe stężenie maksymalne i ekspozycję w osoczu niż związek referencyjny MP-10 wykazując przewagę w tym zakresie. Również dla wszystkich badanych związków analiza farmakokinetyczna wykazała ich obecność w mózgu dowodząc przenikania bariery krew-mózg. Stężenia związków osiągnęte w mózgu przynajmniej 10-krotnie przekraczały wyznaczone wartości  $IC_{50}$  za wyjątkiem związku CPL500020, którego stężenie przekraczało wartość  $IC_{50}$  jedynie pięciokrotnie. Te różnice znajdowały również swoje odzwierciedlenie w parametrze stosunku stężenia mózgu do stężenia w osoczu B/P. Badanie zależności stężeń pomiędzy osoczem a mózgiem dostarcza informacji o dystrybucji związku pomiędzy tymi kompartmentami, będąc jednym z parametrów określających penetrację ośrodkowego układu nerwowego. Większość leków aktywnych w ośrodkowym układzie nerwowym posiada wartość B/P  $> 0,3$  (Doran *i in.*, 2005). W przypadku niniejszego badania farmakokinetycznego wartość B/P dla wszystkich związków wyniosła powyżej 0,45, poza CPL500020, dla którego ta wartość wyniosła 0,09. W związku z niskimi stężeniami w mózgu w stosunku do wartości  $IC_{50}$  oraz niską wartością B/P badania nad związkiem CPL500020 nie były kontynuowane.

W kolejnym kroku analizie podano efekt farmakodynamiczny podania doustnego związków wybranych na podstawie wcześniejszych doświadczeń. Jako marker odpowiedzi



została wybrana podjednostka receptora AMPA – GluR1. Receptory AMPA tworzą tetrametry lub pentamery zbudowane z 4 podjednostek GluR1-4 (Hollmann i Heinemann, 1994). Podwyższone stężenie cAMP w komórce aktywuje PKA, która fosforyluje podjednostkę GluR1 na serynie 845, co prowadzi do zmian funkcji receptora poprzez zwiększenie prawdopodobieństwa jego otwarcia oraz zwiększenia liczby receptorów w błonie w wyniku transportu wewnątrzkomórkowego (Banke *i in.*, 2000; Mangiavacchi i Wolf, 2004). Te procesy przekładają się na zwiększenie amplitudy i długości trwania sygnałów w wyniku pobudzenia sygnałem pochodzącym z kory mózgowej (Banke *i in.*, 2000). Wzrost fosforylacji GluR1 obserwuje się po podaniu agonistów receptora D1 oraz antagonistów receptora D2 (Håkansson *i in.*, 2006). Badania z użyciem inhibitorów PDE10A wykazały również wzrost fosforylacji GluR1 w prążkowie szczurzym – był on obserwowany głównie w ścieżce pośredniej, a podanie MP-10 skutkowało 6-krotnym wzrostem fosforylacji względem kontroli (Threlfell *i in.*, 2009; Grauer *i in.*, 2009). Powyższe badania, w tym uwarunkowanie od aktywacji szlaku zależnego od cyklicznych nukleotydów jak i wzrost sygnału po podaniu inhibitorów PDE10A, potwierdzają, że ocena fosforylacji podjednostki GluR1 w prążkowie może zostać wykorzystana jako marker odpowiedzi na aktywność innowacyjnych inhibitorów PDE10A.

Wyniki przedstawione w obrębie tej pracy pozwoliły na zróżnicowanie podanych związków pod względem efektów farmakodynamicznych. W wyniku podania MP-10 zaobserwowano kilkunastokrotny wzrost fosforylacji GluR1 w prążkowie szczurzym w punktach czasowych 30 min i 1h po podaniu związku (Rycina 8), co koreluje z punktami czasowymi, dla których osiągnięto najwyższe stężenia inhibitora (Rycina 7), potwierdzając wyniki literaturowe (Grauer *i in.*, 2009). Wszystkie badane substancje wykazały profil fosforylacji GluR1 korelujący ze stężeniem związków w tkance mózgu. Jedynie dla związku CPL500032 nie zaobserwowano wzrostu sygnału i w konsekwencji zrezygnowano z jego dalszego rozwoju.

Dwie wyselekcjonowane cząsteczki, CPL500012 i CPL500036, będące przedstawicielami dwóch chemotypów, prezentowały bardzo zbliżony profil właściwości we wszystkich przebadanych aspektach (Tabela 17). Jedynie profil farmakokinetyczny wskazywał na przewagę CPL500012 w tym zakresie z prawie dwukrotnie wyższą ekspozycją i wyższym stężeniem maksymalnym zarówno w osoczu jak i w mózgu po podaniu dożołądkowym. Nie znalazło to jednak przełożenia na poziom fosforylacji GluR1 w doświadczeniu farmakodynamicznym. W związku z tym decyzja o wyborze związku

wiodącego została podjęta na podstawie badania behawioralnego opartego na farmakologicznym modelu psychozy u szczurów. W teście hiperlokomocji indukowanej fencyklidyną na szczurach CPL500036 wykazywał działanie w dawce 10-krotnie niższej niż CPL500012. Te rezultaty wskazały związek CPL500036 jako cząsteczkę o najlepszych właściwościach tym samym z sukcesem kończąc fazę badań przesiewowych.

Tabela 17 Porównanie właściwości dwóch związków o najkorzystniejszym profilu: CPL500012 oraz CPL500036

Parametr	Jednostka	CPL500012	CPL500036
IC <sub>50</sub> (PDE10A)	μM	0,05	0,04
IC <sub>50</sub> (PDE1C)	μM	>10	>10
Cl <sub>int</sub>	μl/min/mg	36,79	34,87
AUC (osocze)	ng*h/ml	5637	3382
B/P (C <sub>max</sub> )	-	0,46	0,49
Fosforylacja GluR1	-	tak	tak
Dawka efektywna w badaniu behawioralnym	mg/kg	1	0,1

## 5.2 Badania nad charakterystyką związku wiodącego CPL500036

Wybór cząsteczki wiodącej jest jedną z kluczowych decyzji w trakcie trwania procesu rozwoju leku. Umożliwia to wykonanie znacząco bardziej zaawansowanych, czasochłonnych i kosztownych badań związku wiodącego, które nie byłoby możliwe do zastosowania na szeroką skalę w procesie selekcji związków w czasie badań przesiewowych. Skupienie prac nad jednym związkiem chemicznym pozwala na wykonanie doświadczeń służących dokładnemu określeniu zarówno losów związku w organizmie (badania farmakokinetyczne) jak i wpływu związku na organizm (badania farmakodynamiczne). Oba rodzaje doświadczeń mają na celu określenie zachowania cząsteczki po podaniu docelową drogą jak i weryfikację terapeutycznego mechanizmu działania.

### 5.2.1 CPL500036 jest związkiem biodostępnym, z dawkozależną ekspozycją i skutecznie penetrującym barierę krew-mózg

Farmakokinetyczne właściwości cząsteczki determinują efekt farmakodynamiczny i z tego względu dalsze badania nad CPL500036 rozpoczęto od dokładnej charakterystyki

farmakokinetycznej. Potrzeba rozszerzenia badań farmakokinetycznych wynika to z ograniczonej ilości informacji dostarczonej przez badanie wykonane w trakcie fazy przesiewowej. Po pierwsze, wyniki wcześniejszego badania nie pozwalają na określenie dokładnej biodostępności i parametrów farmakokinetycznych związku, ponieważ podanie nie uwzględniało podania dożylnego. Po drugie, obejmowało ono podanie jedynie pojedynczej dawki, nie pozwalając na wnioskowanie w zakresie dawkozależnego wzrostu ekspozycji związku. Po trzecie, badanie było wykonane jedynie w ograniczonym zakresie czasowym, nie umożliwiając określenia pełnego przebiegu zależności stężeń od czasu.

Biorąc pod uwagę powyższe czynniki, wykonano analizę parametrów farmakokinetycznych CPL500036 po podaniu dożylnym u szczurów. Czas połowicznej eliminacji związku z organizmu ( $t_{1/2}$ ), wynoszący 1,68 h, jest wystarczający dla rozwoju związków jako kandydatów na lek – kandydaci powinni charakteryzować się czasem połowicznej eliminacji powyżej jednej godziny (Kerns i Di, 2008). Również wartość klirensu całkowitego  $Cl_{tot}$  znajduje się powyżej pożądanej wartości 0,6 l/(h\*kg) (Kerns i Di, 2008). Objętość dystrybucji wskazuje, jak dobrze dany związek dystrybuowany jest w całym organizmie, pośrednio wskazując na możliwość penetracji tkanek peryferyjnych. Uzyskana wartość dla CPL500036 wskazuje na wysoką penetrację tkanek organizmu oraz możliwą zdolność do niespecyficznego wiązania się do tłuszczów czy białek. Ta ostatnia cecha jest charakterystyczna dla związków lipofilowych, jakim jest CPL500036 i może prowadzić do przedłużonej retencji związku w organizmie (Kerns i Di, 2008). Jednak badania nie potwierdziły tendencji do akumulacji i związek był eliminowany do 24h z organizmu w zakresie efektywnych dawek. Uzyskane krzywe farmakokinetyczne po podaniu CPL500036 drogą dożołądkową w czterech dawkach przyjęły podobny przebieg, poza krzywą dla najniższej podanej dawki (Rycina 10). Odmienny przebieg wynika z dużej niepewności pomiarowej przy niskich stężeniach związku, prowadząc do małej dokładności wyników w tym zakresie. Co ważne, zarówno wartości ekspozycji jak i stężenia maksymalne rosną proporcjonalnie w badanym zakresie dawek, co wskazuje na brak niestandardowych efektów farmakokinetycznych, które mogłyby wpływać na interpretację badań farmakodynamicznych czy też dalszy rozwój leku. W porównaniu do badań przesiewowych widoczne jest przesunięcie czasu osiągnięcia stężenia maksymalnego  $t_{max}$  z dwóch na cztery godzin po podaniu. Biorąc pod uwagę, że aktualne badanie zostało wykonane poprzez przyżyciowe pobieranie krwi oraz zgodność kolejnych krzywych, należy uznać, że uzyskany wynik w czasie badań przesiewowych

nie prezentował rzeczywistego przebiegu krzywej. Uzyskane wartości biodostępności mieszczą się w zakresie od 88 do 119%. W tej analizie nie uwzględniam wartości biodostępności dla dawki 0,75 mg/kg, ze względu dużą niepewność pomiarową dla niskich stężeń związku. Wartości powyżej 88% wskazują na bardzo wysoką biodostępność związku w podaniu dożołądkowym. Uzyskana naddostępność, czyli wartość biodostępności powyżej 100% może wynikać z błędu pomiarowego i zbyt mało licznych grup badanych. Wskazywać na to może relatywnie wysokie odchylenie standardowe dla kolejnych punktów czasowych sugerujące duże różnice międzyosobnicze. Nie można również wykluczyć, że rolę może pełnić różnica w podanych dawkach między podaniem dożylnym a doustnym, co skutkuje innym zakresem stężeń w organizmie prowadząc do różnic w procesach metabolicznych (np. wysycenie enzymów metabolizujących) zachodzących w organizmie dla różniących się stężeń związku. Weryfikacja procesów zachodzących dla różnych stężeń wymaga czasochłonnych badań nad transporterami i enzymami metabolizującymi substancję w organizmie, co nie było celem niniejszej pracy, a podanie dożylne nie było możliwe w wyższej dawce ze względu na ograniczoną rozpuszczalność związku. Niemniej CPL500036 prezentuje bardziej preferencyjne wartości biodostępności u szczurów niż związki referencyjne MP-10 oraz TAK-063, które osiągały wartości odpowiednio 30% i 27,4% (Tohyama *i in.*, 2018).

Dokładna charakterystyka farmakokinetyczna obejmowała również powtórzenie doświadczenia analizy stężeń w mózgu szczurów, tym razem w rozszerzonym zakresie czasowym do 24h po podaniu inhibitora. Przebieg krzywej zależności stężenia CPL500036 w osoczu od czasu odpowiada przebiegowi krzywej w badaniu z pobraniem przyżyciowym. Przebieg krzywej zależności stężenia związku w mózgu od czasu prezentuje przebieg odpowiadający krzywej uzyskanej dla osocza. Ten wynik sugeruje, że związek może pasywnie dyfundować przez barierę krew-mózg – reagując na stężenie we krwi. Wartość parametru B/P poniżej 1 sugeruje, iż penetracja bariery krew-mózg może nie być jedynie oparta na transporcie pasywnym, a rolę może odgrywać transport aktywny i transportery efluksowe w błonie oddzielającej światło naczyń i tkankę mózgu.

Parametry farmakokinetyczne CPL500036 zapewniają odpowiednią biodostępność i penetrację bariery krew-mózg, umożliwiając dalsze badania nad farmakodynamicznymi efektami podania związku. Ponadto uzyskane wyniki stanowią podstawę do dalszego rozwoju cząsteczki jako kandydata na lek w podaniu doustnym

### 5.2.2 Podanie CPL500036 prowadzi do wzrostu stężenia cyklicznych nukleotydów w prążkowi i aktywacji genów wczesnej odpowiedzi.

PDE10A jest enzymem, który w największym stopniu odpowiada za rozkład cAMP w średnich neuronach kolczastych oraz bierze udział w hydrolizie cGMP w prążkowi (Fujishige *i in.*, 1999; Russwurm *i in.*, 2015; Mota *i in.*, 2021). Zahamowanie aktywności tego enzymu *in vivo* powinno skutkować wzrostem stężenia cyklicznych nukleotydów w prążkowi. W istocie, podanie zarówno MP-10 jak i TAK-063 prowadzi do wzrostu cyklicznych nukleotydów w tej strukturze mózgu szczurów. TAK-063 zwiększał stężenie cyklicznych nukleotydów w szczurzym prążkowi w dawce od 1 mg/kg dla cAMP i w dawce od 0,3 mg/kg dla cGMP jedną godzinę po podaniu dożołądkowym (Suzuki *i in.*, 2015). Natomiast dla MP-10 istotny wzrost stężenia cAMP i cGMP u szczurów obserwowano odpowiednio dla dawki 10 mg/kg i 30 mg/kg (w obu przypadkach 0,5h po podaniu dożołądkowym związku) (Suzuki *i in.*, 2016).

Dotychczas niedostępne są dane literaturowe dotyczące wpływu podania inhibitorów PDE10A na zależność stężenia cyklicznych nukleotydów w zależności czasu. Z tego względu, w pierwszej kolejności przeprowadzono badanie wpływu inhibitorów PDE10A na stężenie cyklicznych nukleotydów w prążkowi szczurzym w wybranych punktach czasowych między 0,5h do 4h po podaniu CPL500036 i związków referencyjnych MP-10 i TAK-063. Wyniki niniejszej pracy potwierdzają istotny wzrost stężeń obu nukleotydów 2h po podaniu inhibitora CPL500036. Zaobserwowano również wzrost cAMP dla MP-10 0,5h po podaniu, ale ten model eksperymentalny nie wykazał zmian w stężeniach cAMP i cGMP po podaniu TAK-063. Dla punktu czasowego 2h po podaniu CPL500036, dla którego wykazano najwyższe stężenie cyklicznych nukleotydów, obserwowano dawkozależny wzrost stężenia cGMP, natomiast ten efekt nie był obserwowany dla cAMP. Wyniki potwierdzają, że podanie systemowe CPL500036 powoduje wzrost stężenia cyklicznych nukleotydów, potwierdzając bezpośredni efekt zahamowania aktywności PDE10A. Ponadto, pomiar stężeń cAMP oraz cGMP zarówno w korze przedczołowej jak i hipokampie wykazał brak zmian stężenia tych nukleotydów po podaniu inhibitorów PDE10A, potwierdzając specyficzność uzyskiwanego efektu inhibicji enzymu ze względu na ekspresję ograniczoną do prążkowi (Seeger *i in.*, 2003; Coskran *i in.*, 2006).

W świetle danych przedstawionych w 1.4.2, które wskazują, że PDE10A jest głównym enzymem odpowiedzialnym za hydrolizę cAMP, wyniki zaprezentowane dla pomiaru stężenia cAMP w prążkowi mogą budzić wątpliwości skutecznej inhibicji enzymu. Rozważając brak

obserwowanego wzrostu poziomu cAMP w zależności od podanej dawki CPL500036 czy brak efektu dla TAK-063 w różnych punktach czasowych, należy mieć na względzie kilka aspektów. Oczekiwany wzrost stężenia cAMP w szczyrim prądkowiu dla zastosowanych dawek to 39% dla MP-10 i 23% dla TAK-063 odpowiednio 0,5 i 2h od podania (Suzuki *i in.*, 2016). W zaprezentowanych przeze mnie wynikach można odnaleźć podobne wzrosty stężenia cAMP po podaniu MP-10 jak i TAK-063, jednak jedynie dla MP-10 wyniki osiągają poziom istotności statystycznej. Ponadto doniesienia naukowe wskazują, że podanie inhibitorów PDE10A skutkuje podobnym wzrostem stężenia obu nukleotydów w skali bezwzględnej (Schmidt *i in.*, 2008; Malamas *i in.*, 2011; Suzuki *i in.*, 2015). Jednak ze względu na około 10-krotnie wyższe stężenie podstawowe cAMP niż cGMP, wzrost cAMP w skali względnej jest umiarkowany, przez co trudniejszy do zaobserwowania niż dla cGMP (Menniti *i in.*, 2021). Trzecim czynnikiem, mającym związek z pomiarami stężenia dla CPL500036, jest możliwość odchyień w biodostępności związku pomiędzy szczurami, która była obserwowana przede wszystkim po podaniu CPL500036 w dawce 6 mg/kg w badaniu farmakokinetycznym. W połączeniu z wyżej wymienionymi trudnościami, zmienność biodostępności może być kolejnym czynnikiem utrudniającym obserwację wzrostów stężenia cAMP w prądkowiu.

Zwiększone stężenie cAMP lub cGMP aktywuje kaskadę sygnałową opartą na kinazach białkowych PKA i PKG, fosforylacji DARPP-32 oraz defosforylacji PP1 (Fernandez *i in.*, 2006). Dalsze reakcje (patrz 1.3.3) prowadzą do ufosforylowania histonu H3 oraz białka CREB (Hagiwara *i in.*, 1992; Stipanovich *i in.*, 2008). Zarówno histon H3 jak i CREB pełnią kluczową rolę w inicjacji transkrypcji genów, w tym genów wczesnej odpowiedzi. W związku z powyższym analizie podano cztery wybrane geny wczesnej odpowiedzi, które są markerami aktywności neuronalnej i plastyczności – *c-Fos*, *Npas4*, *Egr-1*, *Arc*. Wykazano, że geny te są aktywowane u szczurów przez podanie doustne MP-10 (Gentzel *i in.*, 2015), natomiast podanie TAK-063 zwiększa ekspresję *c-Fos* oraz *Npas4* (Nakatani *i in.*, 2018). Zmiany w ekspresji *c-Fos*, *Arc* i *Egr-1* obserwowane są również w przebiegu schizofrenii, natomiast podanie leków antypsychotycznych powoduje wzrost ekspresji tych genów (Gallo *i in.*, 2018). Geny te zostały wybrane jako markery odpowiedzi w MSN ze względu na stabilną i silną odpowiedź na zastosowanie inhibitorów PDE10A, jak wskazano powyżej.

Przed rozpoczęciem prac związanych z analizą ekspresji genów techniką qRT-PCR dokonano wyboru genów referencyjnych. Na dzień wykonywania doświadczeń nie były dostępne informacje o wyborze genów ulegających stabilnej ekspresji w prądkowiu szczyrim.

Zgodnie z rekomendacjami MiQE (Bustin *i in.*, 2009) przeprowadzono doświadczenie analizujące wpływ różnych czynników pobudzających prążkowie: haloperidol jako antagonist receptoru D2, SKF 38393 jako agonista receptora D1, CPL500036 jako inhibitor PDE10A. Analiza wykazała, że w przypadku badania aktywacji genów w szczurzym prążkowie jako geny referencyjne zastosować należy *Mdh1* i *B2m*.

W poniższej pracy wykazano, że w wyniku podania doustnego CPL500036 oraz inhibitorów referencyjnych dochodzi do silnej indukcji ekspresji wspomnianych genów wczesnej odpowiedzi 3h po podaniu związków. Podobnie jak w przypadku cAMP oraz cGMP, indukcja odpowiedzi następuje specyficznie w prążkowie i nie obserwuje się zmian w korze przedczołowej i hipokampie. Zwiększona ekspresja tych genów jest jednym z elementów prowadzących do indukcji długotrwałych zmiany adaptacyjnych i neuroplastycznych (Girault, 2012).

Gen *c-Fos* koduje białko c-Fos, które reguluje plastyczność neuronalną poprzez tworzenie kompleksu aktywującego AP-1, będące jednym z głównych modulatorów ekspresji genów w komórce (Sheng i Greenberg, 1990; Kaczmarek, 1993). AP-1 stymuluje m.in. aktywność genów kodujących tkankowy inhibitor metaloproteaz 1 (TIMP-1, ang. *tissue inhibitor of metalloproteinases 1*) oraz metaloproteazy macierzy zewnątrzkomórkowej 9 (MMP-9, ang. *matrix metalloproteinase 9*), które bezpośrednio wpływają na plastyczność synaps pobudzających (Kaczmarek, 2018). c-Fos jest jednym z najpowszechniej używanych markerów aktywacji neuronów i jego ekspresja potwierdza aktywację średnich neuronów kolczastych po podaniu inhibitorów PDE10A. Należy również zauważyć, że efekt wzrostu transkrypcji *c-Fos* w niniejszej pracy obserwowany jest 3 godziny po podaniu związków. Zostało wykazane, że indukcja transkrypcji *c-Fos* następuje już 15 min po wystąpieniu czynnika stymulującego i utrzymuje przez ok. 45 minut (Kaczmarek i Chaudhuri, 1997). Istnieją również doniesienia, gdzie wzrost ekspresji *c-Fos* obserwowany jest w mózgu 1-3h po podaniu czynnika stymulującego (Xiu *i in.*, 2014; Barros *i in.*, 2015), również dla MP-10 czy TAK-063 (Wilson *i in.*, 2015; Nakatani *i in.*, 2017). Może to wskazywać na utrzymujący się długotrwały stan aktywacji neuronów, wynikających ze zwrotnych sygnałów stymulujących w obrębie pętli korowo-prążkowo-wzgórzowych (Xiu *i in.*, 2014).

*Arc* należy również do genów wczesnej odpowiedzi, jednak w odróżnieniu od *c-Fos* i pozostałych koduje ekspresję białka synaptycznego. Białko ARC to zwiększa gęstość kolców synaptycznych oraz wpływa na ich wielkość (Peebles *i in.*, 2010). Ponadto, kontroluje

endocytozę GluR1, redukując transport tej podjednostki receptora AMPA do wnętrza komórki, co w połączeniu ze zwiększoną fosforylacją GluR1 (patrz 4.1.5.2) może prowadzić do zmian adaptacyjnych w wyniku podania inhibitorów PDE10A (Fenyk-Melody *i in.*, 2004).

*Egr-1* koduje czynnik transkrypcyjny EGR-1 typu palec cynkowy i jego indukcja może zachodzić w wyniku szeregu różnych czynników takich jak: stres, uszkodzenia, neurotransmitery czy czynniki wzrostu. EGR-1 odpowiada za zmiany związane z plastycznością neuronalną czy wzrostem komórek, wliczając w to indukcję ekspresji białka kluczowego dla średnich neuronów kolczastych DARPP-32 (Knapska i Kaczmarek, 2004; Gallo *i in.*, 2018). Ponadto Gentzel i wsp. (2015) obserwowali, że podanie MP-10 skutkuje indukcją *Egr-1* nie tylko w prążkowiu, ale również korze, jednak uzyskane wyniki w niniejszej pracy nie potwierdzają tej obserwacji. Ponadto postulowana zwiększona odpowiedź *Egr-1* w porównaniu do *c-Fos*, również nie znalazła potwierdzenia.

*Npas4* odgrywa kluczową rolę w kontroli procesu synaptogenezy w średnich komórkach kolczastych, przede wszystkim w neuronach ścieżki bezpośredniej, regulując poziom transkrypcji wielu genów, w tym podjednostek receptora NMDA. Dodatkowo, poziom ekspresji *Npas4* koreluje z poziomem pobudliwości neuronów, świadcząc o regulacji procesów elektrofizjologicznych w neuronach (Lissek *i in.*, 2021). Warto zauważyć, że *Npas4* jest indukowany przez napływ jonów wapnia i jest niezależny od aktywacji PKA przez cykliczne nukleotydy (Lissek *i in.*, 2021). W związku z powyższym, mechanizm indukcji *Npas4* przez inhibitory PDE10A wynika najprawdopodobniej z innych form stymulacji średnich neuronów kolczastych, w zgodzie z hipotezą długotrwałego stanu aktywacji opisanego dla genu *c-Fos*. Należy również zwrócić uwagę, że ścieżka sygnałowa zależna od stężenia cyklicznych nukleotydów reguluje białko NPAS4, które jest fosforylowane przez kinazy MAPK aktywowane przez PKA, prowadząc do zwiększonej aktywności NPAS4 (Funahashi *i in.*, 2019).

Podsumowując, specyficzny wzrost ekspresji genów wczesnej odpowiedzi *c-Fos*, *Arc*, *Egr-1*, *Npas4* w strukturze prążkowiec szczurów w wyniku podania CPL500036 potwierdza oczekiwany mechanizm działania tej cząsteczki. Mając na uwadze rolę opisanych genów wczesnej odpowiedzi w kontroli ekspresji genów, w tym DARPP-32 i podjednostek receptora NMDA, w kontroli gęstości kolców dendrytycznych i ich kształtów czy wpływie na właściwości elektrofizjologiczne neuronów można stwierdzić, że inhibitory PDE10A wpływają na elementy wolnej transmisji synaptycznej, będącej częścią procesu adaptacyjnego komórek – w tym przypadku modulacji działania ścieżek sygnałowych (Greengard, 2001).



### 5.3 Ograniczenie zastosowanych metod

Celem niniejszej pracy była selekcja innowacyjnego inhibitora PDE10A oraz scharakteryzowanie jego właściwości farmakologicznych. W fazie badań przesiewowych zostały podjęte działania mające na celu ocenę wszystkich najważniejszych właściwości, które muszą charakteryzować się kandydaci na lek tj.: patentowalność, aktywność, selektywność, stabilność, rozpuszczalność, biodostępność, bezpieczeństwem. Jednak zakres doświadczeń wykorzystanych w fazie przesiewowej niniejszego projektu był ograniczony, co mogło prowadzić do podejmowania nieodpowiednich decyzji związanych z selekcją związków. Ograniczenia dla wymienionych właściwości zostały przedstawione poniżej.

Pierwszy element, patentowalność, został zaadresowany na etapie przygotowania biblioteki związków, wykluczając struktury nierokujące w tym zakresie, nie prowadząc do ograniczeń. Pozostałe aspekty zostały przebadane za pomocą celowanych, pojedynczych doświadczeń. Jednak wykonanie pojedynczych eksperymentów z danego obszaru niesie za sobą ryzyko nieprawidłowej oceny rzeczywistych właściwości związków.

Badanie aktywności zostało wykonane w postaci oceny inhibicji związków w teście enzymatycznym. Metoda pozwoliła na funkcjonalne określenie zdolności do inhibicji PDE10A pozwalając na uszeregowanie cząsteczek względem tego parametru, nie pozwalając jednak na ocenę właściwości kinetycznych związków, co może być ważne w kontekście efektów terapeutycznych (Suzuki *i in.*, 2016). Należy mieć również na uwadze, że badanie obejmowało jedynie jedną izoformę białka PDE10A: PDE10A1. Mimo braku informacji o różnicach właściwości katalitycznych pomiędzy izoformami, ten aspekt nie został uwzględniony w niniejszym projekcie. Aktywność związków nie była również weryfikowana w modelach komórkowych, które są bardziej złożonym modelem niż doświadczenia z wykorzystaniem rekombinowanego enzymu. Z tego względu na wczesnym etapie nie zostały poddane analizie aspekty penetracji cząsteczek przez błony komórkowe czy zdolność do hamowania PDE10A w żywych komórkach. Aktywność została przeanalizowana jednak w trakcie doświadczeń *in vivo*, w czasie których badano efekty farmakodynamiczne, potwierdzając uzyskane wcześniej wyniki na modelu eksperymentalnym bliższym docelowemu. Analizie została poddana fosforylacja GluR1, jednak na tym etapie nie zostały uwzględnione pozostałe białka odpowiadające na podwyższone stężenie cyklicznych nukleotydów. Dodatkowo nie wykonano także pomiaru stężenia cyklicznych nukleotydów w prążkowiu w czasie tych badań przesiewowych. W efekcie

doświadczenie to nie potwierdziło jednoznacznie, że fosforylacja GluR1 wynika z selektywnego oddziaływania inhibitorów PDE10A z innymi białkami, co mogłoby skutkować aktywacją innych ścieżek sygnałowych prowadzących do fosforylacji tego receptora. Należy jednak mieć na uwadze, że analiza pozostałych możliwych markerów odpowiedzi na inhibicję PDE10A (m.in. DARPP-32, CREB) nie była możliwa ze względu na brak możliwości obserwacji zmian w ich fosforylacji. Wynikało to z metody uśmiercania zwierząt przez dekapitację, w czego efekcie czas potrzebny do izolowania struktur mózgu skutkował zanikiem fosforylacji wielu białek uniemożliwiając taką analizę (O'Callaghan i Sriram, 2004, obserwacje własne).

Rozpuszczalność była wyznaczana na podstawie rozpuszczalności w DMSO w stężeniu 10 mM. Brak rozpuszczalności w tym rozpuszczalniku dyskwalifikował związki z dalszego rozwoju przez brak możliwości wykonania doświadczeń. Należy mieć jednak zwrócić uwagę na fakt, że głównym rozpuszczalnikiem w ciele człowieka jest środowisko wodne o różnym pH. Analiza parametrów rozpuszczalności w roztworach wodnych mogłaby dostarczyć dodatkowych informacji prowadząc do zaprzestania rozwoju nierokujących cząsteczek.

Analiza selektywności w czasie badań przesiewowych została wykonana dla jednego przedstawiciela rodziny fosfodiesteraz. Pozwoliło to na zniwelowanie ryzyka nieselektywnych oddziaływań, z drugiej strony nie wyklucza to interakcji z pozostałymi fosfodiesterazami, co mogłoby prowadzić do niepożądanych efektów.

Badania dotyczące stabilności metabolicznej zostały wykonane na mikrosomach pochodzących ze szczura. Na tej podstawie dokonano selekcji stabilnych związków, jednak ten układ doświadczalny pozwalał jedynie na określenie stabilności u szczurów i tylko w obrębie enzymów tzw. I fazy, nie uwzględniając pozostałych procesów np. glukuronidacji ksenobiotyków. Ten etap był pośrednio częścią wykonanego później doświadczenia farmakokinetycznego wykorzystując bardziej kompleksowy model eksperymentalny, pozwalając zaadresować aspekty metaboliczne w sposób bardziej całościowy sposób.

Selekcja wykonana na podstawie badań farmakokinetycznych została wykonana jedynie na jednym gatunku – szczurze. Niesie to ryzyko, że właściwości farmakokinetyczne nie zostały prawidłowo oszacowane ze względu na możliwość występowania zmienności międzygatunkowej, co może prowadzić nieoczekiwanych rezultatów po podaniu związku ludziom.

Ostatni aspekt – toksyczność – nie była badana jako niezależny parametr w czasie fazy badań przesiewowych i w czasie fazy charakterystyki związku wiodącego. Była jednak

traktowana jako parametr do obserwacji w czasie wykonywania wszystkich doświadczeń, pośrednio dostarczając informacji o występującym efekcie toksycznym. Należy zauważyć, że efekty toksyczne nie występowały w zakresie dawek, dla których obserwowano aktywność i efekty farmakodynamiczne CPL500036.

Innym ograniczeniem w obrębie pracy było zastosowanie jednego gatunku do oceny właściwości. Szczur należy do najpowszechniej używanych gatunków wykorzystywanych do modelowania objawów schizofrenii za pomocą narzędzi farmakologicznych czy genetycznych w celu prowadzenia badań nad cząsteczkami psychoaktywnymi (McGonigle, 2014). Mimo szerokiej możliwości zastosowania tego gryzonia do badania efektów terapeutycznych cząsteczek jako potencjalnych terapii różnych chorób, w tym schizofrenii, szczur jako gatunek modelowy posiada szereg ograniczeń. Pierwszą z nich jest brak występowania schizofrenii i innych schorzeń związanych z jądrami podstawnymi (choroba Parkinsona, choroba Huntingtona) – generalnie chorób psychiatrycznych i neurologicznych – u szczura i innych gatunków gryzoni, ograniczając możliwości interpretacji i bezpośredniej translacji wyników uzyskanych u szczura na człowieka. Ponadto, budowa mózgu, w tym prążkowie, jest u gryzoni prostsza niż u człowieka (Rycina 1). Prążkowie szczura jest zróżnicowane na ścieżki pośrednie i bezpośrednie z odpowiadającą im funkcjonalnością, jednak już jego budowa różni się znacząco. U szczura część brzuszna prążkowie jest proporcjonalnie większa niż u człowieka. Struktury skorupy i jądra ogoniastego nie są rozdzielone u gryzoni jak to ma miejsce u naczelnych. Należy również mieć na uwadze, że kora mózgowa u gryzoni jest proporcjonalnie mniejsza a jej budowa jest mniej skomplikowana (McCutcheon *i in.*, 2019). Te różnice w naturalny sposób ograniczają możliwość bezpośredniego przełożenia uzyskanych wyników w badaniach przedklinicznych na badania kliniczne. PDE10A zarówno u szczura jak i człowieka wykazuje bardzo dużo podobieństw wliczając w to selektywną ekspresję w średnich neuronach kolczastych, powinowactwo do substratów czy też wpływ na ścieżki zależne od inhibicji tego enzymu (Fujishige *i in.*, 1999; Menniti *i in.*, 2007; Megens *i in.*, 2014). Mimo różnic w budowie prążkowie i mózgu, podobieństwa dotyczące PDE10A uzasadniały wykorzystanie modelu szczurzego w badaniach nad inhibicją PDE10A. Należy jednak zaznaczyć, że szczur i człowiek różnią się również ekspresją pojedynczych izoform PDE10A. U człowieka występuje PDE10A1, PDE10A2 oraz PDE10A3, natomiast u szczura jest to PDE10A1 i PDE10A3 (Kotera *i in.*, 2004; MacMullen *i in.*, 2016). Brak jest jednak doniesień o znaczącym wpływie tych różnic na ocenę efektów

zahamowania aktywności PDE10A. Ponadto w ocenie efektów farmakodynamicznych należy podkreślić, że była ona wykonywana dla wszystkich komórek wchodzących w skład prążkowiec, nie tylko średnich neuronów kolczastych, ale również dla komórek glejowych czy interneuronów. Możliwe jest, że obserwowane efekty mogą częściowo pochodzić od innych komórek niż MSN, jednak selektywna ekspresja PDE10A i wybór markerów odpowiedzi, które są obecne w średnich neuronach kolczastych, w znacznym stopniu ograniczają ewentualne nieprawidłowe obserwacje i wnioski.

Podsumowując, należy pamiętać, że zastosowany model doświadczalny jest modelem uproszczonym. Umożliwia on jednak ocenę efektów zastosowania inhibitorów PDE10A w modelach przedklinicznych, co jest niezbędne przed rozpoczęciem badania wybranej cząsteczki u człowieka. Szczur został wybrany ze względu na szerokie zastosowanie tego gryzonia do doświadczeń z modelach chorób związanych z układem nerwowym, możliwości przeprowadzenia szerokiej gamy doświadczeń, w tym farmakokinetycznych i farmakodynamicznych, oraz podobnej roli PDE10A w obu organizmach. Zastosowanie szczurzego modelu pozwoliło na przeprowadzenie badań inhibitorów PDE10A w szerokim zakresie, dzięki czemu było możliwe wykazanie zależności efektów farmakodynamicznych od podania i ekspozycji związków.

#### **5.4 Podsumowanie i perspektywy**

Przeprowadzone badania pozwoliły na odkrycie nowego, nieopisanego wcześniej inhibitora PDE10A. W wyniku badań przesiewowych oraz charakterystyki związku wiodącego wykazano, że CPL500036 jest wysoce aktywną, selektywną, stabilną metabolicznie cząsteczką, o dobrej biodostępności w podaniu doustnym i dobrej penetracji bariery krew-mózg. Jej podanie skutkuje efektami farmakodynamicznymi zgodnymi z oczekiwaniami wysokiego stężenia cAMP lub cGMP w prążkowiec. Badania w niniejszej pracy, wraz z wykonanymi dodatkowymi doświadczeniami nieujętych w niniejszym projekcie doprowadziły do zakończenia fazy badań przedklinicznych z sukcesem i umożliwiły start badań klinicznych wybranego kandydata na lek. W związku z rolą PDE10A w regulacji ścieżek sygnałowych w prążkowiec, pierwotnie wskazanie schizofrenii nie wyczerpuje możliwości potencjalnych terapii z zastosowaniem tego inhibitora. Poza możliwością terapii schizofrenii, inhibicja PDE10A stanowi potencjalną terapię w innych schorzeniach. Na podstawie doniesień przedklinicznych szczególną uwagę przypisuje się zastosowaniu inhibitorów PDE10A

w leczeniu dyskinez wywołanych L-DOPA (ang. *L-3,4-dihydroxyphenylalanine*) w przebiegu choroby Parkinsona, udarze prążkowiec czy autyzmie (Menniti *i in.*, 2007; Jankowska *i in.*, 2018; Baillie *i in.*, 2019). Aktualnie cząsteczka CPL500036 podlega badaniom klinicznym II fazy jako terapia w przebiegu schizofrenii oraz jako przeciwdziałanie dyskinezom wywołanych L-DOPA w przebiegu choroby Parkinsona.

## 6 WNIOSKI

Wyniki niniejszej pracy wykazują, że:

- Zastosowanie badań przesiewowych biblioteki związków pozwoliło na zidentyfikowanie nowych, nieznanych wcześniej cząsteczek selektywnie hamujących aktywność PDE10A.
- Na podstawie powyższych badań cząsteczka CPL500036 została wybrana jako związek wiodący – innowacyjny kandydat na lek.
- CPL500036 posiada dobre właściwości farmakokinetyczne u szczura: wchłaniany jest z układu pokarmowego po podaniu dożołądkowym, wykazuje dawkozależność, skutecznie penetruje barierę krew-mózg.
- Podanie dożołądkowe CPL500036 wywołuje efekty farmakodynamiczne w prążkowie szczurzym, charakterystyczne dla inhibicji PDE10A. Podanie CPL500036 *in vivo* powoduje ograniczone do prążkowie:
  - wzrost stężenia cyklicznych nukleotydów cAMP i cGMP,
  - fosforylację podjednostki GluR1 receptora AMPA,
  - indukcję transkrypcji genów wczesnej odpowiedzi *Arc*, *c-Fos*, *Npas4*, *Egr-1*.

## 7 BIBLIOGRAFIA

1. Alexander GE, Crutcher MD (1990). Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci* 13: 266–271.
2. Altar CA, Boyar WC, Kim HS (1990). Discriminatory roles for D1 and D2 dopamine receptor subtypes in the in vivo control of neostriatal cyclic GMP. *Eur J Pharmacol* 181: 17–21.
3. Andén N-E, Butcher SG, Corrodi H, Fuxe K, Ungerstedt U (1970). Receptor activity and turnover of dopamine and noradrenaline after neuroleptics. *Eur J Pharmacol* 11: 303–314.
4. Arakawa K, Maehara S, Yuge N, Ishikawa M, Miyazaki Y, Naba H, *i in.* (2016). Pharmacological characterization of a novel potent, selective, and orally active phosphodiesterase 10A inhibitor, PDM-042 [(E)-4-(2-(2-(5,8-dimethyl-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrazin-2-yl)vinyl)-6-(pyrrolidin-1-yl)pyrimidin-4-yl)morpholine] in rats: poten. *Pharmacol Res Perspect* 4: e00241.
5. Bailer AJ, Ruberg SJ (1996). Randomization tests for assessing the equality of area under curves for studies using destructive sampling. *J Appl Toxicol* 16: 391–395.
6. Baillie GS, Tejada GS, Kelly MP (2019). Therapeutic targeting of 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterases: inhibition and beyond. *Nat Rev Drug Discov* 18: 770–796.
7. Banke TG, Bowie D, Lee HK, Huganir RL, Schousboe A, Traynelis SF (2000). Control of GluR1 AMPA receptor function by cAMP-dependent protein kinase. *J Neurosci* 20: 89–102.
8. Barros VN, Mundim M, Galindo LT, Bittencourt S, Porcionatto M, Mello LE (2015). The pattern of c-Fos expression and its refractory period in the brain of rats and monkeys. *Front Cell Neurosci* 9: 1–8.
9. Beaumont V, Zhong S, Lin H, Xu W, Bradaia A, Steidl E, *i in.* (2016). Phosphodiesterase 10A Inhibition Improves Cortico-Basal Ganglia Function in Huntington's Disease Models. *Neuron*: 1–18.
10. Bell DS (1973). The Experimental Reproduction of Amphetamine Psychosis. *Arch Gen Psychiatry* 29: 35.
11. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, *i in.* (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin Chem* 55: 611–622.
12. Castro LR V, Brito M, Guiot E, Polito M, Korn CW, Hervé D, *i in.* (2013). Striatal neurones have a specific ability to respond to phasic dopamine release. *J Physiol* 591: 3197–3214.
13. Chappie T a, Helal CJ, Hou X (2012). Current Landscape of Phosphodiesterase 10A (PDE10A) Inhibition. *J Med Chem* 55: 7299–7331.
14. Chappie TA, Humphrey JM, Allen MP, Estep KG, Fox CB, Lebel LA, *i in.* (2007). Discovery of a Series of 6,7-Dimethoxy-4-pyrrolidylquinazoline PDE10A Inhibitors. *J Med Chem* 50: 182–185.
15. Charych EI, Jiang L-X, Lo F, Sullivan K, Brandon NJ (2010). Interplay of Palmitoylation and Phosphorylation in the Trafficking and Localization of Phosphodiesterase 10A: Implications for the Treatment of Schizophrenia. *J Neurosci* 30: 9027–9037.
16. Conti M, Beavo J (2007). Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Annu Rev*

- Biochem* 76: 481–511.
17. Corvol JC, Studler JM, Schonn JS, Girault JA, Hervé D (2001). Gαolf is necessary for coupling D1 and A2a receptors to adenylyl cyclase in the striatum. *J Neurochem* 76: 1585–1588.
  18. Coskran TM, Morton D, Menniti FS, Adamowicz WO, Kleiman RJ, Ryan AM, *i in.* (2006). Immunohistochemical localization of phosphodiesterase 10A in multiple mammalian species. *J Histochem Cytochem* 54: 1205–1213.
  19. DiMasi JA, Grabowski HG, Hansen RW (2016). Innovation in the pharmaceutical industry: New estimates of R&D costs. *J Health Econ* 47: 20–33.
  20. Doran A, Obach RS, Smith BJ, Hosea NA, Becker S, Callegari E, *i in.* (2005). The impact of P-glycoprotein on the disposition of drugs targeted for indications of the central nervous system: evaluation using the MDR1A/1B knockout mouse model. *Drug Metab Dispos* 33: 165–174.
  21. Fenyk-Melody JE, Shen X, Peng Q, Pikounis W, Colwell L, Pivnichny J, *i in.* (2004). Comparison of the effects of perfusion in determining brain penetration (brain-to-plasma ratios) of small molecules in rats. *Comp Med* 54: 378–381.
  22. Fernandez É, Schiappa R, Girault J-A, Novère N Le (2006). DARPP-32 Is a Robust Integrator of Dopamine and Glutamate Signals. *PLoS Comput Biol* 2: e176.
  23. Flanagan RJ, Dunk L (2008). Haematological toxicity of drugs used in psychiatry. *Hum Psychopharmacol Clin Exp* 23: S27–S41.
  24. Fornito A, Harrison BJ, Goodby E, Dean A, Ooi C, Nathan PJ, *i in.* (2013). Functional Dysconnectivity of Corticostriatal Circuitry as a Risk Phenotype for Psychosis. *JAMA Psychiatry* 70: 1143.
  25. Forrest AD, Coto CA, Siegel SJ (2014). Animal Models of Psychosis: Current State and Future Directions. *Curr Behav Neurosci Rep* 1: 100–116.
  26. Fujishige K, Kotera J, Michibata H, Yuasa K, Takebayashi SI, Okumura K, *i in.* (1999). Cloning and characterization of a novel human phosphodiesterase that hydrolyzes both cAMP and cGMP (PDE10A). *J Biol Chem* 274: 18438–18445.
  27. Funahashi Y, Ariza A, Emi R, Xu Y, Shan W, Suzuki K, *i in.* (2019). Phosphorylation of Npas4 by MAPK Regulates Reward-Related Gene Expression and Behaviors. *Cell Rep* 29: 3235–3252.e9.
  28. Gałeczki P, Szulc A (2018). *Psychiatria*. Edra Urban & Partner.
  29. Gallo FT, Kathe C, Morici JF, Medina JH, Weisstaub N V. (2018). Immediate early genes, memory and psychiatric disorders: Focus on c-Fos, Egr1 and Arc. *Front Behav Neurosci* 12: 1–16.
  30. Gentzel RC, Toolan D, Roberts R, Koser AJ, Kandebo M, Hershey J, *i in.* (2015). The PDE10A inhibitor MP-10 and haloperidol produce distinct gene expression profiles in the striatum and influence cataleptic behavior in rodents. *Neuropharmacology* 99: 256–263.
  31. Gerfen CR (2000). Molecular effects of dopamine on striatal-projection pathways. *Trends Neurosci* 23: S64–S70.
  32. Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ, *i in.* (1990). D 1 and D 2 Dopamine Receptor-regulated Gene Expression of Striatonigral and Striatopallidal Neurons. *Science* 250: 1429–1432.
  33. Gerfen CR, Surmeier DJ (2011). Modulation of Striatal Projection Systems by Dopamine. *Annu Rev Neurosci* 34: 441–466.
  34. Girault J (2012). Integrating Neurotransmission in Striatal Medium Spiny Neurons. In:



- Kreutz MR, Sala C (red) *Synaptic Plasticity*, Springer Vienna: Vienna Vol 970, ss 407–429.
35. Gold JM, Waltz JA, Matveeva TM, Kasanova Z, Strauss GP, Herbener ES, *i in.* (2012). Negative Symptoms and the Failure to Represent the Expected Reward Value of Actions. *Arch Gen Psychiatry* 69: 129.
  36. Grabowski T (2010). *Farmakokinetyka i biofarmacja*. www.biokinetica.pl.
  37. Grauer SM, Pulito VL, Navarra RL, Kelly MP, Kelley C, Graf R, *i in.* (2009). Phosphodiesterase 10A Inhibitor Activity in Preclinical Models of the Positive, Cognitive, and Negative Symptoms of Schizophrenia. *J Pharmacol Exp Ther* 331: 574–590.
  38. Greengard P (2001). The neurobiology of slow synaptic transmission. *Science* 294: 1024–1030.
  39. Greengard P, Allen PB, Nairn AC (1999). Beyond the Dopamine Receptor. *Neuron* 23: 435–447.
  40. Haber SN, Knutson B (2010). The Reward Circuit: Linking Primate Anatomy and Human Imaging. *Neuropsychopharmacology* 35: 4–26.
  41. Hagiwara M, Alberts A, Brindle P, Meinkoth J, Feramisco J, Deng T, *i in.* (1992). Transcriptional attenuation following cAMP induction requires PP-1-mediated dephosphorylation of CREB. *Cell* 70: 105–113.
  42. Håkansson K, Galdi S, Hendrick J, Snyder G, Greengard P, Fisone G (2006). Regulation of phosphorylation of the GluR1 AMPA receptor by dopamine D 2 receptors. *J Neurochem* 96: 482–488.
  43. Handa N, Mizohata E, Kishishita S, Toyama M, Morita S, Uchikubo-Kamo T, *i in.* (2008). Crystal Structure of the GAF-B Domain from Human Phosphodiesterase 10A Complexed with Its Ligand, cAMP. *J Biol Chem* 283: 19657–19664.
  44. Harada A, Suzuki K, Kamiguchi N, Miyamoto M, Tohyama K, Nakashima K, *i in.* (2015). Characterization of Binding and Inhibitory Properties of TAK-063, a Novel Phosphodiesterase 10A Inhibitor. *PLoS One* 10: e0122197.
  45. Hemmings HC, Greengard P, Tung HYL, Cohen P (1984). DARPP-32, a dopamine-regulated neuronal phosphoprotein, is a potent inhibitor of protein phosphatase-1. *Nature* 310: 503–505.
  46. Hollmann M, Heinemann S (1994). Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 17: 31–108.
  47. Howes OD, Kambeitz J, Kim E, Stahl D, Slifstein M, Abi-Dargham A, *i in.* (2012). The Nature of Dopamine Dysfunction in Schizophrenia and What This Means for Treatment. *Arch Gen Psychiatry* 69: 776–786.
  48. Howes O, McCutcheon R, Stone J (2015). Glutamate and dopamine in schizophrenia: An update for the 21st century. *J Psychopharmacol* 29: 97–115.
  49. Howes OD, Murray RM (2014). Schizophrenia: An integrated sociodevelopmental-cognitive model. *Lancet* 383: 1677–1687.
  50. Huhn M, Nikolakopoulou A, Schneider-Thoma J, Krause M, Samara M, Peter N, *i in.* (2019). Comparative efficacy and tolerability of 32 oral antipsychotics for the acute treatment of adults with multi-episode schizophrenia: a systematic review and network meta-analysis. *Lancet* 394: 939–951.
  51. Hunnicutt BJ, Jongbloets BC, Birdsong WT, Gertz KJ, Zhong H, Mao T (2016). A comprehensive excitatory input map of the striatum reveals novel functional organization. *Elife* 5: 1–32.

52. Jablensky A (1999). The 100-Year Epidemiology of Schizophrenia. In: *Search for the Causes of Schizophrenia*, Steinkopff: Heidelberg, 3–19.
53. Jaeschke RR, Sowa-Kućma M, Pańczyszyn-Trzewik P, Misztak P, Styczeń K, Datka W (2016). Lurasidone: The 2016 update on the pharmacology, efficacy and safety profile. *Pharmacol Reports* 68: 748–755.
54. Jäger R, Russwurm C, Schwede F, Genieser H-G, Koesling D, Russwurm M (2012). Activation of PDE10 and PDE11 Phosphodiesterases. *J Biol Chem* 287: 1210–1219.
55. James SL, Abate D, Abate KH, Abay SM, Abbafati C, Abbasi N, *i in.* (2018). Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 Diseases and Injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* 392: 1789–1858.
56. Jankowska A, Świerczek A, Wyska E, Gawalska A, Bucki A, Pawłowski M, *i in.* (2018). Advances in Discovery of PDE10A Inhibitors for CNS-Related Disorders. Part 1: Overview of the Chemical and Biological Research. *Curr Drug Targets* 20: 122–143.
57. Johansen KM, Johansen J (2006). Regulation of chromatin structure by histone H3S10 phosphorylation. *Chromosom Res* 14: 393–404.
58. Kaczmarek L (1993). Molecular biology of vertebrate learning: Isc-fos a new beginning? *J Neurosci Res* 34: 377–381.
59. Kaczmarek L (2018). From c-Fos to MMP-9: In control of synaptic plasticity to produce healthy and diseased mind, a personal view. *Postepy Biochem* 64: 101–109.
60. Kaczmarek L, Chaudhuri A (1997). Sensory regulation of immediate-early gene expression in mammalian visual cortex: Implications for functional mapping and neural plasticity. *Brain Res Rev* 23: 237–256.
61. Kahn RS, Sommer IE, Murray RM, Meyer-Lindenberg A, Weinberger DR, Cannon TD, *i in.* (2015). Schizophrenia. *Nat Rev Dis Prim* 1: 15067.
62. Kapur S (2003). Psychosis as a state of aberrant salience: A framework linking biology, phenomenology, and pharmacology in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 160: 13–23.
63. Kegeles LS, Abi-Dargham A, Frankle WG, Gil R, Cooper TB, Slifstein M, *i in.* (2010). Increased Synaptic Dopamine Function in Associative Regions of the Striatum in Schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 67: 231.
64. Kehler J (2013). Phosphodiesterase 10A inhibitors: a 2009 – 2012 patent update. *Expert Opin Ther Pat* 23: 31–45.
65. Kehler J, Kilburn JP (2009). Patented PDE10A inhibitors: novel compounds since 2007. *Expert Opin Ther Pat* 19: 1715–1725.
66. Kerns EH, Di L (2008). *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods*. Elsevier.
67. Kleiman RJ, Kimmel LH, Bove SE, Lanz TA, Harms JF, Romegialli A, *i in.* (2011). Chronic suppression of phosphodiesterase 10A alters striatal expression of genes responsible for neurotransmitter synthesis, neurotransmission, and signaling pathways implicated in Huntington’s disease. *J Pharmacol Exp Ther* 336: 64–76.
68. Knapska E, Kaczmarek L (2004). A gene for neuronal plasticity in the mammalian brain: Zif268/Egr-1/NGFI-A/Krox-24/TIS8/ZENK? *Prog Neurobiol* 74: 183–211.
69. Kola I, Landis J (2004). Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat Rev Drug Discov* 3: 1–5.
70. Kotera J, Sasaki T, Kobayashi T, Fujishige K, Yamashita Y, Omori K (2004). Subcellular Localization of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase Type 10A Variants, and Alteration of the Localization by cAMP-dependent Protein Kinase-dependent Phosphorylation. *J*

- Biol Chem* 279: 4366–4375.
71. Krebs M, Leopold K, Hinzpeter A, Schaefer M (2006). Current schizophrenia drugs: efficacy and side effects. *Expert Opin Pharmacother* 7: 1005–1016.
  72. Kreitzer AC (2009). Physiology and pharmacology of striatal neurons. *Annu Rev Neurosci* 32: 127–147.
  73. Krystal JH, Karper LP, Seibyl JP, Freeman GK, Delaney R, Bremner JD, *i in.* (1994). Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Arch Gen Psychiatry* 51: 199–214.
  74. Kunitomo J, Yoshikawa M, Fushimi M, Kawada A, Quinn JF, Oki H, *i in.* (2014). Discovery of 1-[2-Fluoro-4-(1 H -pyrazol-1-yl)phenyl]-5-methoxy-3-(1-phenyl-1 H -pyrazol-5-yl)pyridazin-4(1 H )-one (TAK-063), a Highly Potent, Selective, and Orally Active Phosphodiesterase 10A (PDE10A) Inhibitor. *J Med Chem* 57: 9627–9643.
  75. Laemmli UK (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
  76. Lakics V, Karran EH, Boess FG (2010). Quantitative comparison of phosphodiesterase mRNA distribution in human brain and peripheral tissues. *Neuropharmacology* 59: 367–374.
  77. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* 46: 3–26.
  78. Lissek T, Andrianarivelo A, Saint-Jour E, Allichon M, Bauersachs HG, Nassar M, *i in.* (2021). Npas4 regulates medium spiny neuron physiology and gates cocaine-induced hyperlocomotion. *EMBO Rep* 22: e51882.
  79. Lodge D, Mercier MS (2015). Ketamine and phencyclidine: the good, the bad and the unexpected. *Br J Pharmacol* 172: 4254–4276.
  80. Loughney K, Snyder PB, Uher L, Rosman GJ, Ferguson K, Florio VA (1999). Isolation and characterization of PDE10A, a novel human 3', 5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Gene* 234: 109–117.
  81. Lugnier C (2006). Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: A new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacol Ther* 109: 366–398.
  82. MacMullen CM, Vick K, Pacifico R, Fallahi-Sichani M, Davis RL (2016). Novel, primate-specific PDE10A isoform highlights gene expression complexity in human striatum with implications on the molecular pathology of bipolar disorder. *Transl Psychiatry* 6: e742.
  83. Maia T V., Frank MJ (2017). An Integrative Perspective on the Role of Dopamine in Schizophrenia. *Biol Psychiatry* 81: 52–66.
  84. Malamas MS, Ni Y, Erdei J, Stange H, Schindler R, Lankau HJ, *i in.* (2011). Highly potent, selective, and orally active phosphodiesterase 10A inhibitors. *J Med Chem* 54: 7621–7638.
  85. Malamas MS, Stange H, Schindler R, Lankau H-J, Grunwald C, Langen B, *i in.* (2012). Novel triazines as potent and selective phosphodiesterase 10A inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 22: 5876–5884.
  86. Mangiavacchi S, Wolf ME (2004). D1 dopamine receptor stimulation increases the rate of AMPA receptor insertion onto the surface of cultured nucleus accumbens neurons through a pathway dependent on protein kinase A. *J Neurochem* 88: 1261–1271.
  87. McCutcheon RA, Abi-Dargham A, Howes OD (2019). Schizophrenia, Dopamine and the Striatum: From Biology to Symptoms. *Trends Neurosci* 42: 205–220.

88. McCutcheon R, Beck K, Jauhar S, Howes OD (2018). Defining the Locus of Dopaminergic Dysfunction in Schizophrenia: A Meta-analysis and Test of the Mesolimbic Hypothesis. *Schizophr Bull* 44: 1301–1311.
89. McCutcheon RA, Reis Marques T, Howes OD (2020). Schizophrenia - An Overview. *JAMA Psychiatry* 77: 201–210.
90. McGonigle P (2014). Animal models of CNS disorders. *Biochem Pharmacol* 87: 140–149.
91. Megens AAHP, Hendrickx HMR, Hens K a, Fonteyn I, Langlois X, Lenaerts I, *i in.* (2014). Pharmacology of JNJ-42314415, a Centrally Active Phosphodiesterase 10A (PDE10A) Inhibitor: A Comparison of PDE10A Inhibitors with D 2 Receptor Blockers as Potential Antipsychotic Drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 349: 138–154.
92. Menniti FS, Chappie TA, Humphrey JM, Schmidt CJ (2007). Phosphodiesterase 10A inhibitors: a novel approach to the treatment of the symptoms of schizophrenia. *Curr Opin Investig Drugs* 8: 54–59.
93. Menniti FS, Chappie TA, Schmidt CJ (2021). PDE10A Inhibitors—Clinical Failure or Window Into Antipsychotic Drug Action? *Front Neurosci* 14: 1–18.
94. Menniti FS, Faraci WS, Schmidt CJ (2006). Phosphodiesterases in the CNS: targets for drug development. *Nat Rev Drug Discov* 5: 660–670.
95. Moszczyński-Pętkowski R, Majer J, Borkowska M, Bojarski Ł, Janowska S, Matłoka M, *i in.* (2018). Synthesis and characterization of novel classes of PDE10A inhibitors - 1H-1,3-benzodiazoles and imidazo[1,2-a]pyrimidines. *Eur J Med Chem* 155: 96–116.
96. Mota É, Bompierre S, Betolngar D, Castro LR V., Vincent P (2021). Pivotal role of phosphodiesterase 10A in the integration of dopamine signals in mice striatal D 1 and D 2 medium-sized spiny neurones. *Br J Pharmacol* 178: 4873–4890.
97. Nagai T, Yoshimoto J, Kannon T, Kuroda K, Kaibuchi K (2016). Phosphorylation Signals in Striatal Medium Spiny Neurons. *Trends Pharmacol Sci* 37: 858–871.
98. Nakatani A, Nakamura S, Kimura H (2017). The phosphodiesterase 10A selective inhibitor, TAK-063, induces c-Fos expression in both direct and indirect pathway medium spiny neurons and sub-regions of the medial prefrontal cortex in rats. *Neurosci Res* 125: 29–36.
99. Nakatani A, Tomimatsu Y, Nakamura S, Kimura H (2018). TAK-063, a selective phosphodiesterase 10A inhibitor with faster off-rate, but not T-609 a slower off-rate phosphodiesterase 10A inhibitor, suppresses phencyclidine-induced excessive neural activation in the rat prefrontal cortex. *Mendeley Data, V1* 1.
100. Narodowy Fundusz Zdrowia (2018). Analiza dotycząca schizofrenii w Polsce ICD - 10 F20 i F21 w latach 2008 - 2017 Warszawa , maj 2018. : 1–12.
101. Nikiforuk A, Potasiewicz A, Rafa D, Drescher K, Bepalov A, Popik P (2016). The effects of PDE10 inhibition on attentional set-shifting do not depend on the activation of dopamine D1 receptors. *Behav Pharmacol* 27: 331–338.
102. Nishi A, Kuroiwa M, Miller DB, O’Callaghan JP, Bateup HS, Shuto T, *i in.* (2008). Distinct roles of PDE4 and PDE10A in the regulation of cAMP/PKA signaling in the striatum. *J Neurosci* 28: 10460–71.
103. Nishi A, Kuroiwa M, Shuto T (2011). Mechanisms for the Modulation of Dopamine D1 Receptor Signaling in Striatal Neurons. *Front Neuroanat* 5: 43.
104. Nishi A, Snyder GL (2010). Advanced Research on Dopamine Signaling to Develop Drugs for the Treatment of Mental Disorders: Biochemical and Behavioral Profiles of Phosphodiesterase Inhibition in Dopaminergic Neurotransmission. *J Pharmacol Sci*

- 114: 6–16.
105. Nr badania clinicaltrials.gov: NCT04624243, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04624243> (dostęp: 31.01.2022)
  106. O’Callaghan JP, Sriram K (2004). Focused microwave irradiation of the brain preserves in vivo protein phosphorylation: comparison with other methods of sacrifice and analysis of multiple phosphoproteins. *J Neurosci Methods* 135: 159–68.
  107. Obayashi S, Sasaki D, Oyama A (2004). Finding Tradeoffs by Using Multiobjective Optimization Algorithms. *Trans Jpn Soc Aeronaut Space Sci* 47: 51–58.
  108. Olney JW, Farber NB (1995). Glutamate receptor dysfunction and schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 52: 998–1007.
  109. van Os J, Kapur S (2009). Schizophrenia. *Lancet* 374: 635–45.
  110. Ouimet CC, Langley-Gullion KC, Greengard P (1998). Quantitative immunocytochemistry of DARPP-32-expressing neurons in the rat caudatoputamen. *Brain Res* 808: 8–12.
  111. Padovan-Neto FE, Sammut S, Chakroborty S, Dec a. M, Threlfell S, Campbell PW, *i in.* (2015). Facilitation of Corticostriatal Transmission following Pharmacological Inhibition of Striatal Phosphodiesterase 10A: Role of Nitric Oxide-Soluble Guanylyl Cyclase-cGMP Signaling Pathways. *J Neurosci* 35: 5781–5791.
  112. Peebles CL, Yoo J, Thwin MT, Palop JJ, Noebels JL, Finkbeiner S (2010). Arc regulates spine morphology and maintains network stability in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 18173–8.
  113. Pillinger T, McCutcheon RA, Vano L, Mizuno Y, Arumham A, Hindley G, *i in.* (2020). Comparative effects of 18 antipsychotics on metabolic function in patients with schizophrenia, predictors of metabolic dysregulation, and association with psychopathology: a systematic review and network meta-analysis. *he lancet Psychiatry* 7: 64–77.
  114. Polito M, Guiot E, Gangarossa G, Longueville S, Doulazmi M, Valjent E, *i in.* (2015). Selective Effects of PDE10A Inhibitors on Striatopallidal Neurons Require Phosphatase Inhibition by DARPP-32. *eNeuro* 2: ENEURO.0060-15.2015.
  115. Russwurm C, Koesling D, Russwurm M (2013). In striatum phosphodiesterase 10A is part of a synaptic signalling complex. *BMC Pharmacol Toxicol* 14: P59.
  116. Russwurm C, Koesling D, Russwurm M (2015). Phosphodiesterase 10A is tethered to a synaptic signaling complex in striatum. *J Biol Chem* 290: 11936–11947.
  117. Sammut S, Bray KE, West AR (2007). Dopamine D2 receptor-dependent modulation of striatal NO synthase activity. *Psychopharmacology (Berl)* 191: 793–803.
  118. Sammut S, Dec A, Mitchell D, Linardakis J, Ortiguela M, West AR (2006). Phasic dopaminergic transmission increases NO efflux in the rat dorsal striatum via a neuronal NOS and a dopamine D(1/5) receptor-dependent mechanism. *Neuropsychopharmacology* 31: 493–505.
  119. Saunders BT, Richard JM, Margolis EB, Janak PH (2018). Dopamine neurons create Pavlovian conditioned stimuli with circuit-defined motivational properties. *Nat Neurosci* 21: 1072–1083.
  120. Schmidt CJ, Chapin DS, Cianfrogna J, Corman ML, Hajos M, Harms JF, *i in.* (2008). Preclinical Characterization of Selective Phosphodiesterase 10A Inhibitors: A New Therapeutic Approach to the Treatment of Schizophrenia. *J Pharmacol Exp Ther* 325: 681–690.
  121. Seeger TF, Bartlett B, Coskran TM, Culp JS, James LC, Krull DL, *i in.* (2003).

- Immunohistochemical localization of PDE10A in the rat brain. *Brain Res* 985: 113–126.
122. Sheng M, Greenberg ME (1990). The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron* 4: 477–485.
  123. Shiraishi E, Suzuki K, Harada A, Suzuki N, Kimura H (2016). The Phosphodiesterase 10A Selective Inhibitor TAK-063 Improves Cognitive Functions Associated with Schizophrenia in Rodent Models. *J Pharmacol Exp Ther* 356: 587–595.
  124. Simpson EH, Kellendonk C, Kandel E (2010). A Possible Role for the Striatum in the Pathogenesis of the Cognitive Symptoms of Schizophrenia. *Neuron* 65: 585–596.
  125. Siuciak JA, McCarthy SA, Chapin DS, Fujiwara RA, James LC, Williams RD, *i in.* (2006). Genetic deletion of the striatum-enriched phosphodiesterase PDE10A: Evidence for altered striatal function. *Neuropharmacology* 51: 374–385.
  126. Smith RJ, Lobo MK, Spencer S, Kalivas PW (2013). Cocaine-induced adaptations in D1 and D2 accumbens projection neurons (a dichotomy not necessarily synonymous with direct and indirect pathways). *Curr Opin Neurobiol* 23: 546–552.
  127. Smith SM, Uslaner JM, Cox CD, Huszar SL, Cannon CE, Vardigan JD, *i in.* (2013). The novel phosphodiesterase 10A inhibitor THPP-1 has antipsychotic-like effects in rat and improves cognition in rat and rhesus monkey. *Neuropharmacology* 64: 215–223.
  128. Soderling SH, Bayuga SJ, Beavo JA (1998). Identification and Characterization of a Novel Family of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases. *J Biol Chem* 273: 15553–15558.
  129. Soderling SH, Bayuga SJ, Beavo JA (1999). Isolation and characterization of a dual-substrate phosphodiesterase gene family: PDE10A. *Proc Natl Acad Sci* 96: 7071–7076.
  130. Steeds H, Carhart-Harris RL, Stone JM (2015). Drug models of schizophrenia. *Ther Adv Psychopharmacol* 5: 43–58.
  131. Stipanovich A, Valjent E, Matamales M, Nishi A, Ahn J-H, Maroteaux M, *i in.* (2008). A phosphatase cascade by which rewarding stimuli control nucleosomal response. *Nature* 453: 879–884.
  132. Strauss GP, Frank MJ, Waltz JA, Kasanova Z, Herbener ES, Gold JM (2011). Deficits in Positive Reinforcement Learning and Uncertainty-Driven Exploration Are Associated with Distinct Aspects of Negative Symptoms in Schizophrenia. *Biol Psychiatry* 69: 424–431.
  133. Strick C a, James LC, Fox CB, Seeger TF, Menniti FS, Schmidt CJ (2010). Alterations in gene regulation following inhibition of the striatum-enriched phosphodiesterase, PDE10A. *Neuropharmacology* 58: 444–451.
  134. Surmeier DJ, Ding J, Day M, Wang Z, Shen W (2007). D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends Neurosci* 30: 228–235.
  135. Suzuki K, Harada A, Shiraishi E, Kimura H (2015). In Vivo Pharmacological Characterization of TAK-063, a Potent and Selective Phosphodiesterase 10A Inhibitor with Antipsychotic-Like Activity in Rodents. *J Pharmacol Exp Ther* 352: 471–479.
  136. Suzuki K, Harada A, Suzuki H, Miyamoto M, Kimura H (2016). TAK-063, a PDE10A Inhibitor with Balanced Activation of Direct and Indirect Pathways, Provides Potent Antipsychotic-Like Effects in Multiple Paradigms. *Neuropsychopharmacology* 41: 2252–2262.
  137. Suzuki K, Kimura H (2018). TAK-063, a novel PDE10A inhibitor with balanced activation of direct and indirect pathways, provides a unique opportunity for the treatment of schizophrenia. *CNS Neurosci Ther* 24: 604–614.
  138. Świerczek A, Jankowska A, Chłoń-Rzepa G, Pawłowski M, Wyska E (2019). Advances in

- the Discovery of PDE10A Inhibitors for CNS-Related Disorders. Part 2: Focus on Schizophrenia. *Curr Drug Targets* 20: 1652–1669.
139. Szulc A, Samochowiec J (2019). *Schizofrenia z objawami negatywnymi. Obciążenie chorobą pacjentów i ich bliskich*. Termedia.
  140. Threlfell S, Sammut S, Menniti FS, Schmidt CJ, West AR (2009). Inhibition of Phosphodiesterase 10A Increases the Responsiveness of Striatal Projection Neurons to Cortical Stimulation. *J Pharmacol Exp Ther* 328: 785–795.
  141. Tohyama K, Sudo M, Morohashi A, Kato S, Takahashi J, Tagawa Y (2018). Pre-clinical Characterization of Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion Properties of TAK-063. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 122: 577–587.
  142. Tsai M, Chrones L, Xie J, Gevorkyan H, Macek TA (2016). A phase 1 study of the safety, tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of TAK-063, a selective PDE10A inhibitor. *Psychopharmacology (Berl)* 233: 3787–3795.
  143. Verhoest PR, Chapin DS, Corman M, Fonseca K, Harms JF, Hou X, *i in.* (2009). Discovery of a Novel Class of Phosphodiesterase 10A Inhibitors and Identification of Clinical Candidate 2-[4-(1-Methyl-4-pyridin-4-yl-1 H -pyrazol-3-yl)-phenoxy-methyl]-quinoline (PF-2545920) for the Treatment of Schizophrenia†Coordinates of the PDE10A cry. *J Med Chem* 52: 5188–5196.
  144. Verhoest PR, Fonseca KR, Hou X, Proulx-LaFrance C, Corman M, Helal CJ, *i in.* (2012). Design and Discovery of 6-[(3 S ,4 S )-4-Methyl-1-(pyrimidin-2-ylmethyl)pyrrolidin-3-yl]-1-(tetrahydro-2 H -pyran-4-yl)-1,5-dihydro-4 H -pyrazolo[3,4- d ]pyrimidin-4-one (PF-04447943), a Selective Brain Penetrant PDE9A Inhibitor for the Treatment of Cogni. *J Med Chem* 55: 9045–9054.
  145. Wager TT, Hou X, Verhoest PR, Villalobos A (2010). Moving beyond Rules: The Development of a Central Nervous System Multiparameter Optimization (CNS MPO) Approach To Enable Alignment of Druglike Properties. *ACS Chem Neurosci* 1: 435–449.
  146. Wang H, Liu Y, Hou J, Zheng M, Robinson H, Ke H (2007). Structural insight into substrate specificity of phosphodiesterase 10. *Proc Natl Acad Sci* 104: 5782–5787.
  147. Waring MJ, Arrowsmith J, Leach AR, Leeson PD, Mandrell S, Owen RM, *i in.* (2015). An analysis of the attrition of drug candidates from four major pharmaceutical companies. *Nat Rev Drug Discov* 14: 475–486.
  148. West AR, Tseng KY (2011). Nitric oxide-soluble guanylyl cyclase-cyclic GMP signaling in the striatum: New targets for the treatment of Parkinson’s disease? *Front Syst Neurosci* 5: 1–9.
  149. Wilson JM, Ogden AML, Loomis S, Gilmour G, Baucum AJ, Belecky-Adams TL, *i in.* (2015). Phosphodiesterase 10A inhibitor, MP-10 (PF-2545920), produces greater induction of c-Fos in dopamine D2 neurons than in D1 neurons in the neostriatum. *Neuropharmacology* 99: 379–386.
  150. Xiu J, Zhang Q, Zhou T, Zhou TT, Chen Y, Hu H (2014). Visualizing an emotional valence map in the limbic forebrain by TAI-FISH. *Nat Neurosci* 17: 1552–1559.
  151. Zhang J-H (1999). A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J Biomol Screen* 4: 67–73.

## 8 PUBLIKACJE DOKTORANTA

1. Lenda T, Ossowska K, Berghauzen-Maciejewska K, Matłoka M, Pieczykolan J, Wieczorek M, Konieczny J. (2021). Antiparkinsonian-like effects of CPL500036, a novel selective inhibitor of phosphodiesterase 10A, in the unilateral rat model of Parkinson's disease. *Eur J Pharmacol* 910: 174460.
2. Pankiewicz P, Szybiński M, Kisielewska K, Gołębiowski F, Krzemiński P, Rutkowska-Włodarczyk I, Moszczyński-Pętkowski R, Gurba-Bryśkiewicz L, Delis M, Mulewski K, Smuga D, Dominowski J, Janusz A, Górka M, Abramski K, Napiórkowska A, Nowotny M, Dubiel K, Kalita K, Wieczorek M, Pieczykolan J, Matłoka M. (2021). Do small molecules activate the TrkB receptor in the same Manner as BDNF? Limitations of published TrkB low molecular agonists and screening for novel TrkB orthosteric agonists. *Pharmaceuticals* 14: 704.
3. Bazydło-Guzenda K, Buda P, Matłoka M, Mach M, Stelmach F, Dzida R, Smuga D, Hucz-Kalitowska J, Teska-Kaminska M, Vialichka V, Dubiel K, Kaminska B, Wieczorek M, Pieczykolan J. (2021). CPL207280, a novel G protein-coupled receptor 40/free fatty acid receptor 1-specific agonist, shows a favorable safety profile and Exerts Antidiabetic Effects in Type 2 Diabetic Animals. *Mol Pharmacol* 100: 335–347.
4. Mach M, Bazydło-Guzenda K, Buda P, Matłoka M, Dzida R, Stelmach F, Gałązka K, Wąsińska-Kałwa M, Smuga D, Hołowińska D, Dawid U, Gurba-Bryśkiewicz L, Wiśniewski K, Dubiel K, Pieczykolan J, Wieczorek M. (2021). Discovery and development of CPL207280 as new GPR40/FFA1 agonist. *Eur J Med Chem* 226: 113810.
5. Sikora J, Podsiedlik M, Pietras T, Kosmalski M, Matłoka M, Moszczyński-Pętkowski R, Wieczorek M, Markowicz-Piasecka M. (2020). Quetiapine and novel PDE10A inhibitors potentiate the anti-BuChE activity of donepezil. *J Enzyme Inhib Med Chem* 35: 1743–1750.
6. Popik P, Khoo SY, Kuziak A, Golebiowska J, Potasiewicz A, Hogendorf A, Popik O, Matłoka M, Moszczyński R, Nikiforuk A, Witkin JM. (2020). Distinct cognitive and discriminative stimulus effects of ketamine enantiomers in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 197: 173011.
7. Hogendorf AS, Hogendorf A, Kurczab R, Kalinowska-Tłuścik J, Popik P, Nikiforuk A, Krawczyk M, Satała G, Lenda T, Knutelska J, Bugno R, Staroń J, Pietruś W, Matłoka M, Dubiel K, Moszczyński-Pętkowski R, Pieczykolan J, Wieczorek M, Pilarski B, Zajdel P, Bojarski AJ. (2019). 2-Aminoimidazole-based antagonists of the 5-HT6 receptor – A new concept in aminergic GPCR ligand design. *Eur J Med Chem* 179: 1–15.
8. Staroń J, Kurczab R, Warszycki D, Satała G, Krawczyk M, Bugno R, Lenda T, Popik P, Hogendorf AS, Hogendorf A, Dubiel K, Matłoka M, Moszczyński-Pętkowski R, Pieczykolan J, Wieczorek M, Zajdel P, Bojarski AJ. (2019). Virtual screening-driven discovery of dual 5-HT6/5-HT2A receptor ligands with pro-cognitive properties. *Eur J Med Chem* 185: 111857.
9. Moszczyński-Pętkowski R, Majer J, Borkowska M, Bojarski Ł, Janowska S, Matłoka M, Stefaniak F, Smuga D, Bazydło K, Dubiel K, Wieczorek M. (2018). Synthesis and characterization of novel classes of PDE10A inhibitors - 1H-1,3-benzodiazoles and imidazo[1,2-a]pyrimidines. *Eur J Med Chem* 155: 96–116. \*
10. Grychowska K, Kurczab R, Śliwa P, Satała G, Dubiel K, Matłoka M, Moszczyński-Pętkowski R, Pieczykolan J, Bojarski AJ, Zajdel P. (2018). Pyrroloquinoline scaffold-



- based 5-HT<sub>6</sub>R ligands: Synthesis, quantum chemical and molecular dynamic studies, and influence of nitrogen atom position in the scaffold on affinity. *Bioorganic Med Chem* 26: 3588–3595.
11. Mazur M, Bujak A, Matloka M, Janowska S, Gunerka P, Bojarski L, Stanczak A, Klejman A, Bednarek A, Lamparska-Przybysz M, Wieczorek M. (2015). Cell-based assay for low- and high-scale screening of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling modulators. *Anal Biochem* 475: 56–67.
  12. Fuchs H, Gailus-Durner V, Adler T, Aguilar-Pimentel JA, Becker L, Calzada-Wack J, Da Silva-Buttkus P, Neff F, Götz A, Hans W, Hölter SM, Horsch M, Kastenmüller G, Kemter E, Lengger C, Maier H, Matloka M, Möller G, Naton B, Prehn C, Puk O, Rácz I, Rathkolb B, Römisch-Margl W, Rozman J, Wang-Sattler R, Schrewe A, Stöger C, Tost M, Adamski J, Aigner B, Beckers J, Behrendt H, Busch DH, Esposito I, Graw J, Illig T, Ivandic B, Klingenspor M, Klopstock T, Kremmer E, Mempel M, Neschen S, Ollert M, Schulz H, Suhre K, Wolf E, Wurst W, Zimmer A, Hrabě de Angelis M. (2011). Mouse phenotyping. *Methods* 53: 120–135.

\* - praca będąca przedmiotem rozprawy

## 9 SPIS RYCIN

Rycina 1 Schemat połączeń nerwowych prążkowiec ze śródmózgiem u naczelnych i gryzoni. ....	16
Rycina 2 Ścieżki pośrednia i bezpośrednia w prążkowiec procesują sygnały w przeciwstawnym sposobie. ....	18
Rycina 3 Ścieżka sygnałowa zależna od stężenia cyklicznych nukleotydów.....	21
Rycina 4 Schemat najważniejszych izoform PDE10A u ludzi i gryzoni. ....	24
Rycina 5 Inhibicja PDE10A normuje aktywność neuronów w prążkowiec w schizofrenii. ....	28
Rycina 6 Proces rozwoju leku drobnocząsteczkowego. ....	32
Rycina 7 Profile farmakokinetyczne związków w badaniu przesiewowym.....	59
Rycina 8 Analiza fosforylacji GluR1 jako markera odpowiedzi na inhibicję PDE10A przez MP-10, CPL500012, CPL500032 lub CPL500036.....	60
Rycina 9 Profil farmakokinetyczny związku CPL500036 w osoczu szczurów, którym podano związek dożylnie w dawce 0,3 mg/kg.....	65
Rycina 10 Profil farmakokinetyczny związku CPL500036 w osoczu szczurów, którym podano związek dożylnie w dawce 0,3 mg/kg.....	67
Rycina 11 Profil farmakokinetyczny związku CPL500036 w osoczu oraz w mózgu szczurów, którym podano związek dożoładkowo w dawce 3 mg/kg (n=4/punkt czasowy). ....	69
Rycina 12 Analiza stężeń cAMP w szczurzych ekstraktach z wybranych struktur mózgu w zależności od czasu od podania inhibitorów PDE10A oraz podanej dawki CPL500036.....	72
Rycina 13 Analiza stężeń cGMP w szczurzych ekstraktach z mózgu w zależności od czasu od podania inhibitorów PDE10A oraz podanej dawki CPL500036. ....	73
Rycina 14 Analiza stabilności ekspresji dla 12 genów celem wyboru genów referencyjnych dla prążkowiec szczura.....	75
Rycina 15 Analiza ekspresji genów <i>c-Fos</i> , <i>Arc</i> , <i>Egr-1</i> i <i>Npas4</i> w prążkowiec, korze przedczołowej oraz hipokampie szczurzym po podaniu CPL500036 lub związków referencyjnych MP-10 i TAK-063.....	77

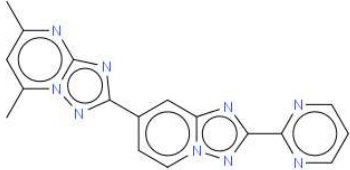
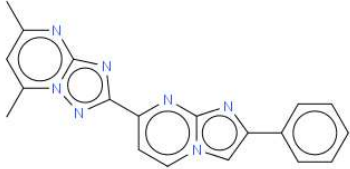
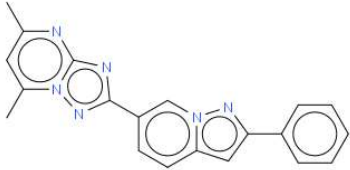
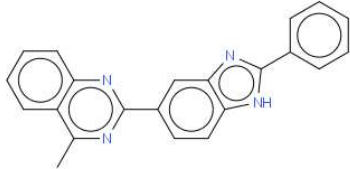
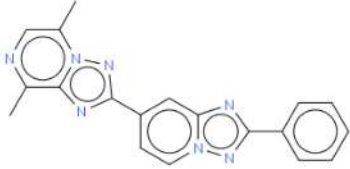
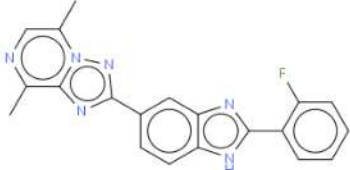
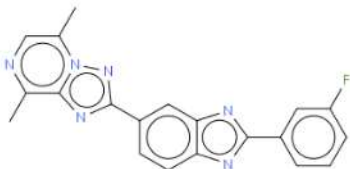
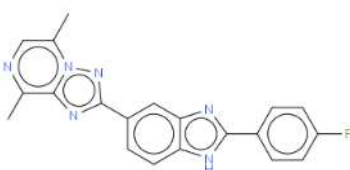
## 10 SPIS TABEL

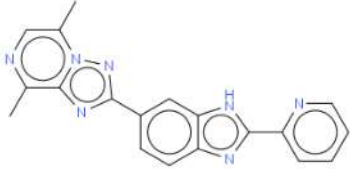
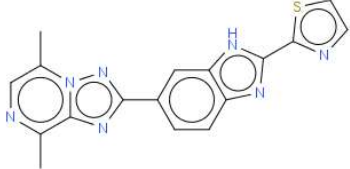
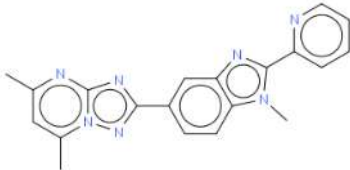
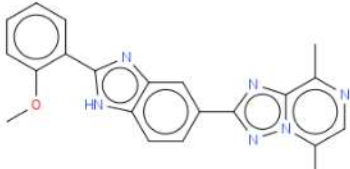
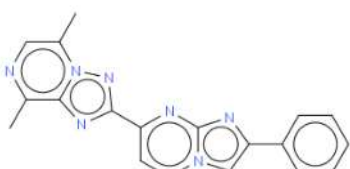
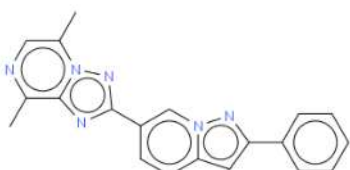
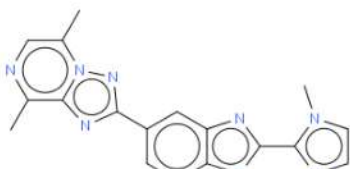
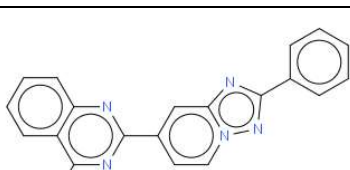
Tabela 1 Skład buforów i roztworów stosowanych w doświadczeniach.....	34
Tabela 2 Biblioteka związków stanowiących potencjalne inhibitory PDE10A.....	36
Tabela 3 Lista przeciwciał stosowanych w metodzie Western blot.....	44
Tabela 4 Skład mieszaniny reakcyjnej dla reakcji odwrotnej transkrypcji .....	49
Tabela 5 Skład mieszaniny reakcyjnej dla reakcji qRT-PCR mającej na celu wybór genów referencyjnych .....	49
Tabela 6 Program reakcji wyboru genów referencyjnych.....	50
Tabela 7 Lista sond TaqMan .....	50
Tabela 8 Skład mieszaniny reakcyjnej dla reakcji qRT-PCR.....	51
Tabela 9 Program reakcji qRT-PCR .....	51
Tabela 10. Badanie przesiewowe rozpuszczalności, aktywności i selektywności.....	53
Tabela 11 Wybór cząsteczek o największym potencjalne rozwoju na podstawie rankingu Pareto maksymalizującego wartości MPO i minimalizującego wartości IC <sub>50</sub> . .....	55
Tabela 12 Ocena stabilności metabolicznej wybranych związków poprzez reakcję z mikrosomami szczurzymi. ....	56
Tabela 13 Wybrane parametry farmakokinetyczne związków MP-10, CPL500012, CPL500020, CPL500032 oraz CPL500036.....	58
Tabela 14 Parametry farmakokinetyczne związku CPL500036 po podaniu dożylnym szczurom w dawce 0,3 mg/kg.....	65
Tabela 15 Wybrane parametry farmakokinetyczne związku CPL500036 na podstawie przeprowadzonego farmakokinetycznego badania po podaniu dożołądkowym dawek 0,75-6 mg/kg u szczurów. ....	68
Tabela 16 Wybrane parametry farmakokinetyczne związku CPL500036 w kompartmentcie mózgowym oraz w osoczu na podstawie przeprowadzonego farmakokinetycznego badania po podaniu dożołądkowym u szczurów: .....	69
Tabela 17 Porównanie właściwości dwóch związków o najkorzystniejszym profilu: CPL500012 oraz CPL500036.....	82

## 11 ZAŁĄCZNIK

Tabela Z1 Biblioteka związków przekazana do badań przesiewowych. MW – masa molowa, clogP – obliczony współczynnik podziału, clogD – obliczony współczynnik podziału przy pH 7,4, TPSA – pole powierzchni polarnej, HBD – donory wiązań wodorowych, bpK<sub>a</sub> – stopień dysocjacji dla zasady

Nazwa związku	Struktura	MW	clogP	clogD	TPSA	HBD	bpK <sub>a</sub>
CPL500007		340,14	4,48	4,48	71,76	1	4,85
CPL500008		341,13	4,64	4,64	69,11	0	0,24
CPL500010		354,16	4,72	4,72	60,90	0	4,73
CPL500012		340,14	4,14	4,14	71,76	1	4,71
CPL500013		341,14	3,63	3,63	84,65	1	1,99
CPL500014		341,14	3,25	3,25	84,65	1	4,89
CPL500015		341,14	4,77	4,77	73,27	0	1,51

CPL500017		343,13	3,54	3,54	99,05	0	-0,14
CPL500020		341,14	3,61	3,61	73,27	0	2,41
CPL500021		340,14	4,8	4,8	60,38	0	1,86
CPL500024		336,14	5,36	5,36	54,46	1	4,88
CPL500026		341,14	4,43	4,43	73,27	0	1,61
CPL500027		358,13	4,63	4,63	71,76	1	4,33
CPL500028		358,13	4,63	4,63	71,76	1	4,65
CPL500029		358,13	4,63	4,63	71,76	1	4,75

CPL500030		341,14	3,29	3,29	84,65	1	1,99
CPL500032		347,10	3,12	3,11	84,65	1	3,15
CPL500034		355,16	3,87	3,87	73,74	0	1,88
CPL500035		370,40	4,28	4,28	80,99	1	4,43
CPL500036		341,14	3,27	3,27	73,27	0	2,41
CPL500037		354,16	4,46	4,46	60,38	0	1,86
CPL500039		344,15	2,06	2,06	89,58	1	4,81
CPL500040		337,13	5,66	5,66	55,97	0	2,67